



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

**PRODUCCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES VÍA FOTOSÍNTESIS,  
PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

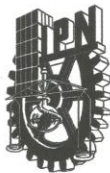
**P R E S E N T A**

**M en C María del Pilar Bremauntz Michavila**

DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Luis Carlos Fernández Linares

COMITE TUTORIAL.  
Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva  
Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas  
Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos  
Dr. Claudio Garibay Orijel

**MÉXICO 2011**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D.F. siendo las 12:00 horas del día 10 del mes de noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis titulada:

"Producción de azúcares fermentables vía fotosíntesis, para la producción de bioetanol"

Presentada por el alumno:

Bremauntz  
Apellido paterno  
Nombre(s) María del Pilar

Michavila  
Apellido materno

Con registro: 

B	0	8	2	0	1	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctora en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

Dr. Luis Carlos Fernández Linares

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

Dr. Claudio Garubay Orijel

Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos

Dra. Rosa Olivía Cañizares Villanueva

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México el día 10 del mes noviembre del año 2011, la que suscribe Ma. Del Pilar Bremauntz Michavila alumna del Programa de Doctorado en Bioprocesos con número de registro B 082010, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Luis Carlos Fernández Linares y cede los derechos del trabajo intitulado "Producción de azúcares vía fotosíntesis, para la producción de bioetanol", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección lfernandezl@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**María del Pilar Bremauntz Michavila**

Nombre y firma

### Declaración de originalidad

"Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."



María del Pilar Bremauntz Michavila  
Nombre del estudiante.



Dr. Luis Carlos Fernández Linares  
Vo. Bo. del director de tesis.

"Yo María del Pilar Bremauntz Michavila declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi director de tesis y mi comité tutorial en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."

Este trabajo de investigación se realizó gracias al apoyo financiero del Programa de Formación de Investigadores (PIFI) SIP 20090559 y SIP20100242 del Instituto Politécnico Nacional. Así como el Proyecto CONACyT 82699 (2008-2009)

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Bioprocesos de la Unidad Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI).

Agradezco al Dr. Luis Fernández por la oportunidad que me brindó

Agradezco sinceramente a cada uno de los miembros de mi comité tutorial en especial al Dr. Luis Torres por su incondicional apoyo así como a la Dra. Rosa O. Cañizares por compartir su experiencia y su conocimiento conmigo.

Una parte medular del desarrollo de este trabajo en cuanto al análisis de azúcares mediante HPLC, se realizó gracias al apoyo del Laboratorio Central Analítica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV, en especial a la Profesora Elvira Ríos, al Ing. Cirino Rojas y al Técnico Gustavo Medina. Muchas gracias.....

Igualmente quiero agradecer a la Dra. Ma. Esther Meave de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, por su apoyo en la identificación de las cepas.

*A mi padre.....  
Que siempre ha estado en cada una de mis luchas y lo estará por siempre.*

*A mi Rodrigo, que cada día me llena de entusiasmo, fuerza y motivación, gracias por cada instante....*

*Gracias mamá por tu apoyo y por enseñarme a ser integra, trabajadora, ordenada, disciplinada y tenaz*

*Gracias Miguel por tus consejos, tu paciencia, por escucharme, por guiarme en este proceso y ser mi asesor personal.....*

*A Tí ,  
cada uno de mis amigos y compañeros del Laboratorio de Bioprocesos por su apoyo, su  
compañía su ayuda, su confianza, su complicidad:  
Sandy, Evelyn Juilio, Silvia, Montserrat, Sandra, Roberto, Dainiz, Benjamín.*

*G R A C I A S..... los voy a extrañar*

*Gracias Kary por tu amistad, tus consejos, tu compañía.*

## RESUMEN

En la actualidad, la obtención de combustibles sostenibles, como el biodiesel y el bioetanol, a partir de materiales baratos y renovables es un reto. En los últimos años, un nuevo enfoque de desarrollo consiste en la producción de azúcares vía fotosintética a partir de algas. Es posible incrementar la producción de azúcares sometiendo a las microalgas a estrés osmótico (osmorregulación). El objetivo de este estudio es demostrar la producción de azúcares a partir de microalgas, aisladas de fuentes naturales, así como el efecto del estrés osmótico sobre la acumulación de azúcares fermentables. Se describe el aislamiento de cada una de las cepas, la producción de azúcares de cada una y el efecto del estrés osmótico en el crecimiento y la producción de azúcares. Se aislaron doce cepas de microalgas, con producción de biomasa entre 0.6 y 1.8 g de peso seco de biomasa/L, todas las cepas produjeron azúcares intracelular y extracelulares. La cepa identificada como *Chlorella* sp. mostró un aumento en la producción de azúcares de 23,64 a 421 mg de azúcares / g de peso de biomasa seca a las 24 h del estrés osmótico con 0,4 M de NaCl. Los osmolitos producidos para esta cepa fueron sacarosa, glicerol y trehalosa, siendo esta última la primera vez que se reporta en la literatura. La producción de los osmolitos se realizó en las primeras 12h después del choque osmótico y después de ese tiempo los osmolitos fueron difundidos al medio. Se determinó la presencia de etanol en el medio después del choque osmótico, lo cual puede deberse a actividad de las vías fermentativas alternas en algas, las cuales podrían manipularse para producir directamente etanol.

## ABSTRACT

At present, obtaining sustainable fuels such as biodiesel and bioethanol from cheap and renewable materials is a challenge. In recent years, a new approach to development is the production of sugars via photosynthesis from algae. You can increase the production of sugars by subjecting algae to osmotic stress (osmoregulation). The aim of this study is to demonstrate the production of sugars from algae, isolated from natural sources, as well as the effect of osmotic stress on the accumulation of fermentable sugars. We describe the isolation of each of the strains, the production of sugar each, and the effect of osmotic stress on growth and production of sugars. Twelve strains were isolated from microalgae, with biomass production between 0.6 and 1.8 g dry biomass/L, all strains produced intracellular and extracellular sugars. The strain identified as *Chlorella* sp. showed an increase in the production of sugars from 23.64 to 421 mg sugar/g of dry biomass at 24 h of osmotic stress with 0.4M NaCl. Osmolytes produced for this strain were sucrose, glycerol and trehalose, the latter being the first reported in the literature. The production of the osmolytes was performed in the first 12h after osmotic shock and after that osmolytes are released to the environment. Ethanol was found in the medium after osmotic shock, which may be due to fermentative activity of alternative pathways in algae, which could be manipulated to directly produce ethanol



## Índice

INDICE DE FIGURAS.....	10
INDICE DE TABLAS .....	11
I INTRODUCCIÓN.....	12
II ANTECEDENTES.....	13
2.1.- Los combustibles fósiles y su efecto en el medio ambiente.....	13
2.2.- Energías Renovables. ....	15
2.2.1.- <i>Bioetanol</i> .....	21
3.- Microalgas .....	27
3.1 <i>Cianobacterias</i> .....	27
3.2.- <i>Microalgas eucariotas</i> .....	30
3.3. <i>Producción a gran escala de productos a partir de microalgas</i> .....	33
4. Osmorregulación.....	36
III OBJETIVOS: .....	42
Objetivo General .....	42
Objetivos particulares: .....	42
IV HIPÓTESIS .....	42
V MATERIALES Y MÉTODOS. ....	43
1. Estrategia metodológica.....	43
2. Aislamiento de microalgas a partir de aguas continentales .....	43
2.1 <i>Sitios de muestreo</i> .....	43
2.2 <i>Medios de Cultivo</i> .....	44
2.3. <i>Condiciones de cultivo</i> .....	45
2.4. <i>Aislamiento</i> .....	45
3. Cinéticas de crecimiento.....	46
4. Análisis de carbohidratos intra y extracelulares.....	46
5. Efecto del estrés salino en crecimiento y del choque osmótico en la producción de azúcares. ....	47
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
1.- Aislamiento de microalgas a partir de aguas continentales .....	48
2. Identificación y cinéticas de crecimiento de las cepas aisladas.....	50
3. Producción de azúcares intra y extracelulares de las cepas aisladas. ....	53
3.1 <i>Caracterización de las cepas seleccionadas</i> .....	55
4. Efecto de la concentración de NaCl en el crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> , <i>Trebouxia sp.</i> , <i>Scenedesmus sp.</i> y <i>Chrysothrix sp.</i> .....	57
5.- Efecto del choque osmótico en la producción de azúcares.....	60
VIII PERSPECTIVAS.....	74
IX BIBLIOGRAFÍA.....	75
X ANEXO.....	84
Productos de investigación.....	84

## INDICE DE FIGURAS











Figura 1. Distribución del uso de energéticos a nivel mundial durante el año 2010 (REN 21, 2010).	16
Figura 2: Esquema general de la producción de bioetanol (Budny, 2007)	24
Figura 3: Vía metabólica <i>Embden-Meyerhof-Parnas</i>	25
Figura 4. Estructura de la trehalosa y sacarosa.	40
Figura 5. Estrategia metodológica	43
Figura 6. Cinéticas de crecimientos de las cepas aisladas en medio BG11.	52
Figura 7. Producción de azúcares totales de cada una de las cepas aisladas.	53
Figura 8. Fotografías en microscopio óptico de <i>Chlorella</i> sp. 100x , <i>Scenedesmus</i> sp. 100x, <i>Trebouxia</i> sp 100x en lugol y <i>Chrysothrix</i> sp. 100x en lugol	56
Figura 9. Efecto de la concentración de NaCl en el crecimiento de <i>Chlorella</i> sp..	57
Figura 10. Efecto de la concentración de NaCl en el crecimiento de <i>Trebouxia</i> sp..	58
Figura 11. Efecto de la concentración de NaCl en el crecimiento de <i>Chrysothrix</i> sp..	59
Figura 12. Efecto de la concentración de NaCl en el crecimiento de <i>Scenedesmus</i> sp..	59
Figura 13. Efecto del choque osmótico en la producción total de azúcares en <i>Chlorella</i> sp. en medio BG11. Azúcares intracelulares  , azúcares extracelulares 	60
Figura 14. Efecto del choque osmótico en la producción total de azúcares en <i>Trebouxia</i> sp. en medio BG11. Azúcares intracelulares  , azúcares extracelulares 	61
Figura 15. Efecto del choque osmótico en la producción total de azúcares en <i>Chrysothrix</i> sp. en medio BG11. Azúcares intracelulares  , azúcares extracelulares 	62
Figura 16. Efecto del choque osmótico en la producción total de azúcares en <i>Scenedesmus</i> sp. en medio BG11. Azúcares intracelulares  , Azúcares extracelulares 	63
Figura 17. Cromatogramas por HPLC de sacarosa (A) y trehalosa (B), Extracto de <i>Chlorella</i> sp., sin choque osmótico(C) y con choque osmótico de 0.4 M después de 24 h (D)	64
Figura 18. Cromatogramas de HPLC del extracto extracelular de <i>Scenedesmus</i> sp., sin choque osmótico(A) y con choque osmótico de 0.1 M después de 24 h (B)	66
Figura 19. Cromatogramas de HPLC del extracto intracelular de <i>Scenedesmus</i> sp., sin choque osmótico(A) y con choque osmótico de 0.1 M después de 24 h (B)	66
Figura 20. Resultados de la producción total de azúcares intracelular  y extracelulares  , de <i>Chlorella</i> sp.: A. sin choque osmótico. B. Con choque osmótico con 0.4 M NaCl,	68

Figura 21 Cromatogramas de HPLC de los extractos A biomasa, B sobrenadante, obtenidos después de 12 h de choque osmótico con 0.4 M NaCl.	70
Figura 22 Cromatogramas de HPLC de los extractos A biomasa, B sobrenadante, obtenidos después de 16 h de choque osmótico con 0.4 M NaCl.	71
Figura 23 Cromatograma de HPLC de un estándar de etanol	72

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Distribución de la producción mundial de biodiesel durante 2009 (WEO 2010).	19
Tabla 2. Distribución de la producción mundial de bioetanol durante 2009 (WEO, 2010)	20
Tabla 3 Grupos, órdenes y géneros de las cianobacterias.	28
Tabla 4. División taxonómica y propiedades de las microalgas.	31
Tabla 5. Grupos representativos de algas y cianobacterias halotolerantes y halófilas y los solutos compatibles que acumulan en respuesta a la concentración de sal en su ambiente.	38
Tabla 6: Resultados de: pH, salinidad, enriquecimiento y aislamiento de las muestra de cuerpos acuíferos.	48
Tabla 7. Identificación, lugar de origen, biomasa producida y factor de eficiencia de las algas aislada.	51
Tabla 8. Producción de azúcares intracelulares, extracelulares y totales; y factor de eficiencia de las cepas asiladas.	54
Tabla 9.Efecto del choque osmótico en la producción de azúcares	64
Tabla 10. Tabla comparativa de resultados de velocidad específica de crecimiento, rendimiento de azúcares totales y producción de osmolitos como carbohidratos fermentable para las cepas de <i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp., aisladas.	67
Tabla 11. Concentración de azucares intra y extracelulares a las 12 y 16 h después del choque osmótico de <i>Chlorella</i> sp..	70

## I INTRODUCCIÓN.

El cambio en el mercado, la investigación, la industria y las políticas de las energías renovables se ha incrementado rápidamente en los últimos años. Las tendencias en el consumo mundial de combustibles, reflejan un incremento significativo en la energía renovable comparado con la energía convencional. Para 2010 las energías renovables presentaron un punto de inflexión en el contexto global del suministro de energía (REN 2010). Durante ese año la energía renovable alcanzó una cuarta parte del suministro mundial de energía. El avance se ha reflejado en todo los tipos de energías renovables: energía eólica, biomasa, energía solar fotovoltaica, energía geotérmica, concentración de energía solar térmica, calentamiento solar de agua, obtención de calor mediante biomasa y geotermia, y biocombustibles. Esta última comprende bioetanol, biodiesel y biogás, representa apenas un equivalente de energía del 5% de la producción mundial de gasolina.

Actualmente el bioetanol se produce a nivel industrial, los cinco principales productores son: Estados Unidos, Brasil, China, Canadá y Francia. La producción anual de bioetanol fue de 76 billones de litros durante 2009; de esta producción, una tercera parte provino de maíz y otra tercera parte de caña y el resto de residuos celulósico, ocasionando la carestía y encarecimiento de los alimentos, la competencia por tierras de cultivo y la deforestación, haciendo al bioetanol una opción poco sustentable. La obtención de azúcares a través de la fotosíntesis de microalgas permitiría tener una fuente renovable y sustentable de materia prima para producir bioetanol.

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos oxigénicos, las cuales se encuentran en ambientes muy diversos desde acuáticos salados, salobres y dulces; hasta ambientes tan extremos como desiertos. La mayoría de las especies son fotoautotrófas y como tales presentan la capacidad de producir azúcares a partir de CO<sub>2</sub> y luz (Joset, 1996; Satoh, 1998; Chow, 2003,). Dicha producción se puede incrementar como respuesta al estrés osmótico generado por salinidades elevadas. Este tipo de mecanismo se conoce como osmorregulación o haloadaptación, que involucra la acumulación de osmorreguladores, moléculas orgánicas que permiten restablecer la presión osmótica sin afectar las estructuras

celulares o el metabolismo. El tipo de osmorregulador acumulado, depende de la respuesta específica de cada tipo de alga y la concentración salina; ejemplos de estos son los carbohidratos sencillos, tales como la sacarosa, trehalosa, manosa y rafinosa (Hershokovitz, 1991).

El presente trabajo tuvo como objetivo principal estudiar el efecto del estrés y el choque osmótico en la obtención de azúcares fermentables a partir de microalgas aisladas de diferentes ecosistemas ambientales.

## **II ANTECEDENTES**

### ***2.1.- Los combustibles fósiles y su efecto en el medio ambiente.***

Los combustibles fósiles consisten básicamente en depósitos de organismos que alguna vez estuvieron vivos y que a través de los siglos al someterse a cambios climáticos, presiones así como los depósitos inorgánicos naturales del lugar se forma la materia orgánica, que consiste básicamente en enlaces carbón- hidrógeno en diferentes arreglos moleculares. Existen tres tipos de combustibles fósiles: el carbón, el petróleo y el gas natural. El carbón se formó durante millones de años por el depósito y caída de material vegetal, que al compactarse y calentarse forma el carbón. El petróleo es un combustible fósil líquido formado por restos de microorganismos marinos depositados en el fondo del mar y que después de millones de años estos depósitos y sedimentos quedaron atrapados entre espacios de rocas porosas. El gas natural es un combustible gaseoso muy versátil, abundante y relativamente limpio al igual que el petróleo, proviene de microorganismos marinos depositados.

Aproximadamente el 70% de la energía primaria proviene del petróleo, el carbón y gas natural. En los próximos cuarenta años será más difícil producir petróleo, debido a que será cada vez más pesado, más difícil de extraer y refinar, lo que afecta directamente el costo de producción de combustibles. Otros factores que definen el mercado y el precio del petróleo son la política, la economía y las tecnologías disponibles (REN 21, 2010).

Uno de los retos más importantes que enfrentará la sociedad en las próximas décadas será cubrir la creciente demanda de energía de forma segura y sustentable. Es un hecho que la demanda de energía crecerá potencialmente en los próximos años. En 2007, el consumo mundial de energéticos fue de alrededor de 12,300 Mtoe (Millones de toneladas equivalentes a petróleo =  $5.4 \times 10^{11}$  GJ) y se estima que para el año 2030 el consumo se eleve hasta 16,750 Mtoe ( $7.03 \times 10^{11}$  GJ) (Boyle, 2004; IEA, 2006 y IEA, 2010). Este dato en términos de barriles significa que la demanda crecerá de 84 mb/d en 2009 hasta 99 mb/d para 2035.

El uso de combustibles fósiles implica gran cantidad de problemas ambientales, los cuales abarcan aire, suelo y aguas. El agua y el suelo generalmente se contaminan por derrames del petróleo crudo o hidrocarburos refinados; los cuales pueden presentarse tanto en terminales de distribución, pozos, refinerías y distribución por tubería entre otros (PEMEX, 2007). En cuanto a la contaminación atmosférica, el uso de combustibles fósiles es el principal responsable de fenómenos tales como la lluvia ácida, el efecto invernadero y el calentamiento global (Godfrey, 2004; Koonin, 2008).

La atmósfera actual contiene alrededor de 750 Petagramos (mil millones de toneladas) de carbono como  $\text{CO}_2$ . En las últimas décadas el incremento de la concentración de  $\text{CO}_2$  en el aire ha sido alrededor de 3 Pg por año (Chow, 2003). La quema de combustibles fósiles, produce una media global de las emisiones de carbono a la atmósfera en forma de  $\text{CO}_2$  de una tonelada por año por persona.

Se considera que antes del inicio de la Revolución Industrial, la concentración de bióxido de carbono en la atmósfera era de unas 280 ppm de la mezcla de gases de aire y a principios del siglo XXI alcanzó 375 ppm. En los últimos años el incremento anual de la concentración de bióxido de carbono ha sido en promedio de 1.5 ppm, es decir 0.4% anual.

El aumento antropogénico del bióxido de carbono produce un incremento radioactivo en superficie de aproximadamente 1.4W por metro cuadrado del fuerza radioactiva, provocado por el incremento de gases de efecto invernadero (Myhre, 1998; Hansen, 2001), que a su vez, se estima, genera un incremento directo de la temperatura media global de 0.5°C y si

las emisiones no son controladas aumentará de 1.4 a 5.8°C para finales del siglo XXI, en el peor de los escenarios, si no se llevan medidas precautorias (Godfrey, 2004). Este incremento de temperatura se vería reflejado en una elevación del nivel del mar de 0.5 m para finales de siglo, lo cual implicaría que el mar inundaría gran parte del área continental y si este efecto no se controla, se pronostica que para el año 2100 se derretirá la mayoría del hielo de la Antártida.

Las alternativas para disminuir estos efectos nocivos al medio ambiente producidos por los combustibles fósiles, son el desarrollo de tecnología y aplicación de energías renovables.

## **2.2.- Energías Renovables.**

Según el Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), se consideran Fuentes Renovables de energía aquellas formas energéticas que se regeneran de manera natural, o aquella cuya tasa de utilización no afecta la existencia de la fuente energética. Igualmente pueden definirse como la energía obtenida de ciclos continuos y repetitivos que ocurren en el ambiente, tales como la luz solar, aire, mareas, actividad geotérmica, entre otras. El desarrollo de las energías renovables ha crecido considerablemente en los últimos años, de 2004 a 2010 el uso, investigación y desarrollo en las áreas de energéticos alternos incrementó en promedio un 50% (REN 2010)

Para el año 2010 se estimó que el 78% de la energía empleada provino de energéticos fósiles y aproximadamente 22% de energéticos renovables. Dentro de los energéticos renovables, 2.8% provino de la energía nuclear, 13% de la biomasa tradicional, 3.2 % de la generación de energía eléctrica a través del viento, el sol, biomasa y geotérmica, 1.4% del calentamiento a través de la energía solar, biomasa y geotérmica y 0.6% a partir de los biocombustibles (Fig. 1) (REN, 2010).

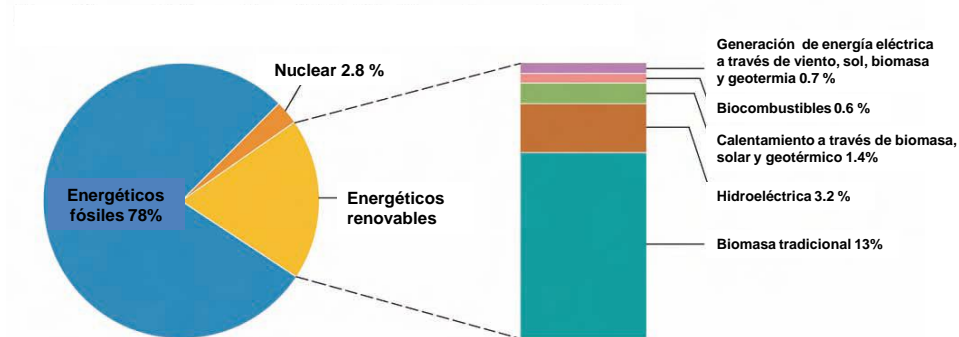


Figura 1. Distribución del uso de energéticos a nivel mundial durante el año 2010 (REN 21, 2010).

Las energías renovables se clasifican en: eólica, hidráulica, solar, geotérmica, mareomotriz y biocombustibles (Godfrey, 2004). La energía eólica es la energía obtenida del viento, es decir, de la energía cinética generada por efecto de las corrientes de aire y así mismo de las vibraciones que el aire produce. La energía del viento es transformada mediante máquinas eólicas (o aeromotores) en energía mecánica de rotación y energía eléctrica. El sistema de conversión es conocido como aerogenerador. La baja densidad energética por unidad de superficie de la energía eólica, trae como consecuencia la necesidad de instalar un gran número de aerogeneradores, para el aprovechamiento de los recursos disponibles. El ejemplo más típico de una instalación eólica está representado por los “parques eólicos” que consisten de varios aerogeneradores implantados en el terreno conectado a una línea única que los conecta a la red eléctrica local o nacional.



Para el año 2009, la energía eólica alcanzó una producción récord de 38 GW, ocupando el primer lugar en esta materia, China con 13.8 GW, lo cual representó la tercera parte del mercado mundial, seguida por Estados Unidos (EWEA, 2007; Heliocentric Energiesysteme, 2009; IdaTech, 2009).

La energía hidráulica, puede usarse en sus energías fundamentales: cinética, térmica o con gradientes de salinidad y actualmente es la tecnología que se encuentra más avanzada para la producción de energía eléctrica. Dentro de las tecnologías empleadas para su uso a nivel industrial mundialmente están la energía hidroeléctrica, microsistemas de generadores hidroeléctricos, sistemas hidráulicos en presas, energía del océano y gradientes de salinidad.

La energía solar se puede transformar en energía térmica o eléctrica (Solarweb, 2009). En el primer caso la energía solar es aprovechada para elevar la temperatura de un fluido, como por ejemplo el agua, y en el segundo caso la energía luminosa actúa sobre la superficie de un material semiconductor (ej el silicio), y produce el movimiento de los electrones que componen la estructura atómica del material. El movimiento de electrones produce una corriente eléctrica que se puede utilizar como fuente de energía de componentes eléctricos o bien electrónicos (celdas fotovoltaicas).

La energía geotérmica se obtiene por extracción del calor interno de la Tierra. En áreas de aguas termales muy calientes de poca profundidad, se perforan dichos yacimientos a través de fracturas naturales de las rocas basales o dentro de rocas sedimentarios. El agua caliente o el vapor puede fluir de manera natural, por bombeo o por impulsos de flujos de agua y de vapor. Los recursos de magma (rocas fundidas) ofrecen energía geotérmica de temperatura muy elevada, pero con la tecnología existente esas fuentes no se pueden aprovechar económicamente. Existen varios tipos de procesos de conversión de energía para generar electricidad por medio de recursos hidrotermales. Actualmente, tres de estos procesos se encuentran en operación comercial: vapor seco, sistemas de separación de vapor y ciclo binario (Renewable Energy, 1997).

Otro tipo de energía renovable es el hidrógeno, que tiene aplicaciones sobre todo en las celdas de hidrógeno o de combustible. Una celda de combustible genera electricidad combinando hidrógeno y oxígeno electroquímicamente sin ninguna combustión de una manera directa y por lo tanto eficiente. Estas celdas no se agotan como lo haría una batería en tanto se les alimenta el combustible hidrógeno y el oxidante. Así generarán energía eléctrica y calor mientras se les provea de combustible, siendo el agua pura el único subproducto que se genera y como reacción es exotérmica también se produce calor. La manera en que las celdas de combustible operan es mediante una celda electroquímica que consiste en dos electrodos, un ánodo y un cátodo, separados por un electrolito (European Renewable Energy Council. Renewable Energy Road Map, 2008).

Los biocombustibles se pueden clasificar en: biomasa tradicional (sólida), gases y biocombustibles líquidos. La primera se ha empleado desde hace miles de años y consiste en emplear residuos vegetales o incluso municipales orgánicos, para producir energía calorífica. En cuanto a los gases; el biogás es el gas combustible que se produce de forma natural en pantanos o fosas, y también puede ser producido en sistemas diseñados específicamente para fermentar aguas negras, o residuos orgánicos a través de biodigestores. El biogás es 40-70 % metano y bióxido de carbono y pequeñas cantidades de hidrógeno, nitrógeno y ácido sulfhídrico. Puede ser empleado para producir energía eléctrica mediante turbinas o plantas generadoras a base gas o directamente como combustible en hornos, calderas, estufas u otros sistemas de combustión. El biohidrógeno puede producirse, en ausencia de oxígeno, a través de organismos fotosintéticos tales como cianobacterias y microalgas, en fermentación oscura, en cuyo proceso intervienen dos tipos de enzimas: hidrogenasas y nitrogenasas (Melis, 2004; Nath, 2005); o puede ser producido por bacterias anaerobias en un proceso de fermentación, (Okamoto, 2000), la materia prima pueden ser residuos vegetales o residuos sólidos urbanos, en los que se desarrollan los microorganismos, que producen hidrógeno. Los biocombustibles líquidos son el bioetanol y el biodiesel.

El biodiesel se fabrica a partir de aceites vegetales puros o gastados, los cuales se someten a un proceso de transesterificación, para producir los ésteres correspondientes (Ma, 1999). Dentro de las fuentes de aceites que se emplean para la producción del biodiesel están la soya, canola, *Jatropha curca* y palma, e incluso las microalgas (Posten, 2009). Esta última alternativa se muestra atractiva ya que el empleo de microalgas para producir biodiesel no requiere grandes extensiones de campos de cultivo como en el caso de las plantas; por otro lado se han encontrado microalgas con alto contenido de lípidos tales como *Botryococcus braunii* 25–75 % , *Schizochytrium* sp 50–77%, y *Neochloris oleoabundans* 35–54%, entre otras especies (Chisti, 2007).

La producción mundial de biodiesel en el 2009 fue de 16.6 millones de litros, con una tasa de crecimiento anual del 41.9% (Tabla 1).

Tabla 1.- Distribución de la producción mundial de biodiesel durante 2009 (WEO 2010).

País	Kb/d
Unión Europea	140
Estados Unidos	33
Brasil	25
China	6
India	2
Otros	51
<b>Total</b>	<b>257</b>

Kb=miles de barriles.

En cuanto al bioetanol, conocido también como etanol de biomasa, generalmente se obtiene a partir de caña de azúcar, maíz, trigo, cebada, sorgo, remolacha o incluso de residuos lignocelulósicos, como tallos y hojas (Lin, 2006). La producción mundial de bioetanol en 2009 fué de 855 Kb/d (WEO 2010) (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de la producción mundial de bioetanol durante 2009 (WEO, 2010)

País	Kb/d
Estados Unidos	470
Brasil	287
Unión Europea	38
China	24
Canadá	13
India	3
Otros	20
<b>Total</b>	<b>855</b>

Kb=miles de barriles

La mayoría del bioetanol se produce a partir de cultivos agrícolas, siendo la caña de azúcar la materia prima de mayor rendimiento (9000 L/ Ha/año), seguida de la remolacha, la yuca, el sorgo dulce y el maíz (NEVC, 2008).

Es importante mencionar que el uso de cultivos primarios para la producción de biocombustibles ha causado problemas en este sector agrícola, ya que los precios de los cultivos han aumentado y se ha producido igualmente una competencia entre el uso de cultivos para alimento y el uso para la producción de combustibles, aunado a la deforestación causada por el incremento en la demanda de suelos agrícolas. En Italia, el aumento del precio de la pasta se asocia directamente al uso de los cultivos para la producción de bioetanol, este fenómeno ocurre igualmente en países como Argentina con la carne y en España con el pan (Koonin, 2008).

Este tipo de fenómenos presenta al bioetanol como un biocombustible no sustentable, ya que la materia prima empleada y la demanda del mercado de este combustible, crean un problema social de probable escasez de alimentos. Es por ello que se ha iniciado un nuevo campo para el desarrollo de una tecnología diferente dirigida a la obtención de bioetanol a partir de materia prima alternativa a los cultivos, un ejemplo es emplear residuos celulósicos

de agro cultivos (Morris, 2007), e incluso técnicas biotecnológicas para la producción de azúcares a través de diferentes microorganismos (Mitra, 2008; Posten, 2009).

### **2.2.1.- Bioetanol**

El alcohol etílico o etanol es un producto químico obtenido a partir de la fermentación de los azúcares que se encuentran en los productos vegetales, tales como cereales, remolacha, caña de azúcar, sorgo o cualquier otro tipo de biomasa. Se denomina bioetanol por su procedencia a partir de biomasa y de producción microbiana (Azhar, 1981), a diferencia del etanol de origen químico.

En el proceso de fermentación alcohólica se obtiene el alcohol hidratado, con un contenido aproximado de 5% de agua, el cual debe ser destilado para poderse utilizar como combustible. El bioetanol mezclado con la gasolina produce un biocombustible de alto poder energético, con características muy similares a la gasolina, pero con una importante reducción de las emisiones contaminantes en los motores tradicionales de combustión. El etanol se usa en mezclas con la gasolina en concentraciones del 5 o del 10%, E5 y E10 respectivamente, que no requieren modificaciones en los motores actuales, ya que en estos casos se emplea como oxigenante de la gasolina, es decir se usa en forma de aditivo de la gasolina como etil-terbutil éter (ETBE).

Un obstáculo importante es la legislación europea sobre la volatilidad de las gasolinas que fija la proporción de etanol en mezclas E5. Concentraciones más elevadas, autorizadas en Suecia y Estados Unidos, implican que se debe disponer de un vehículo flexible (FFV), con un depósito, motor y sistema de combustible único, capaz de funcionar con gasolina y etanol, solos o mezclados en cualquier proporción. Para poder usar etanol directamente es importante considerar los siguientes aspectos: el octanaje del etanol es mayor (129 research octane number (ROM)) que el de la gasolina (91/92 ROM), por lo que se tendría que cambiar el coeficiente de compresión para obtener un rendimiento adecuado; se requiere de

carburadores y caudales más grandes y cambiar el sistema de arranque en frío (Brent, 1996). Estos hechos hacen más atractivo el uso de mezclas etanol-gasolina.

Algunos ejemplos de uso comercial del etanol se encuentran disponibles como E10 ampliamente usado en Dinamarca y en Brasil. Otra mezcla interesante es el E85 (15% gasolina, 85% etanol), tiene un octanaje de 106, que ha sido empleado en España, Colombia y Brasil (Gazeta Mercantil, 2008). La industria automovilística brasileña desarrolló vehículos que operan con flexibilidad en el tipo de combustible, llamados vehículos de combustible flexible, popularmente conocidos como "flex" en Brasil, ya que el motor funciona con cualquier proporción de gasolina (mezcla E20-E25) y etanol hídrico (E100) (Goettemoeller, 2007)

En ciertos aspectos el bioetanol no se puede considerar un combustible sustentable, debido básicamente al uso de materias primas que compiten con la alimentación, estableciendo un problema social importante. Sin embargo, existe otro problema en cuanto a su uso, no presenta necesariamente un balance de energía neto positivo, el cual puede definirse como el cociente entre la energía producida (como etanol) y el total de la energía consumida (en el cultivo de las plantas, procesamiento de los cultivos y todos los pasos involucrados en el proceso de obtención del etanol) (Mousdale, 2008).

El balance de energía neto del uso del bioetanol está ligado a su ciclo de vida. Para hacer el balance es necesario considerar la cantidad energía contenida en el producto final, la cantidad de energía consumida directamente para hacer el etanol (incluyendo los combustible empleados en la producción de los cultivos), la cantidad de etanol que resulta comparando a la cantidad de gasolina refinada y la energía consumida indirectamente (para hacer la planta de proceso de etanol) (Fargione, 2008). Algunos estudios (NREL 2007, Oxfam 2007, NEVC 2008), sugieren que el etanol a partir de cultivos requiere tanta o más energía que la producción de los combustibles fósiles; sin embargo, es importante considerar no solo la cantidad de energía, sino la calidad de la misma, cuyos efectos económicos pueden ser importantes, tales efectos económicos y ambientales pueden estar

implicados en la contaminación de suelos por derrames de combustibles, así como los costos médicos implicados en la contaminación atmosférica resultado de la refinación y la combustión de los energéticos fósiles.

En el aspecto energético, las ventajas del etanol sobre la gasolina probablemente no son obvias; sin embargo, desde el punto de vista de la disminución de emisiones contaminantes a la atmósfera, suelo y agua, así como el hecho de que la materia prima es renovable; se fortalece el aspecto sustentable del uso de etanol. Si a esto se aúna la posibilidad de encontrar materias primas para la producción de etanol que disminuyan el número de pasos en el proceso e incluso que no empleen materia prima proveniente de la agricultura, tales como residuos celulósicos u otras fuentes de azúcares, el potencial del bioetanol como biocombustible se eleva considerablemente.

El bioetanol, se obtiene principalmente a partir de los azúcares provenientes de diversas plantas, en general se utilizan tres familias diferentes de productos para su obtención (Bailey 1993) (Figura 1):

- La caña de azúcar o la remolacha llamada primera generación
- Los cereales mediante la fermentación de los azúcares obtenidos de la hidrólisis del almidón, segunda generación.
- Residuos lignocelulósicos, por la fermentación de los azúcares contenidos en la celulosa y hemicelulosa (RSU), tercera generación.

## BIOETANOL: 1°, 2° y 3° generación

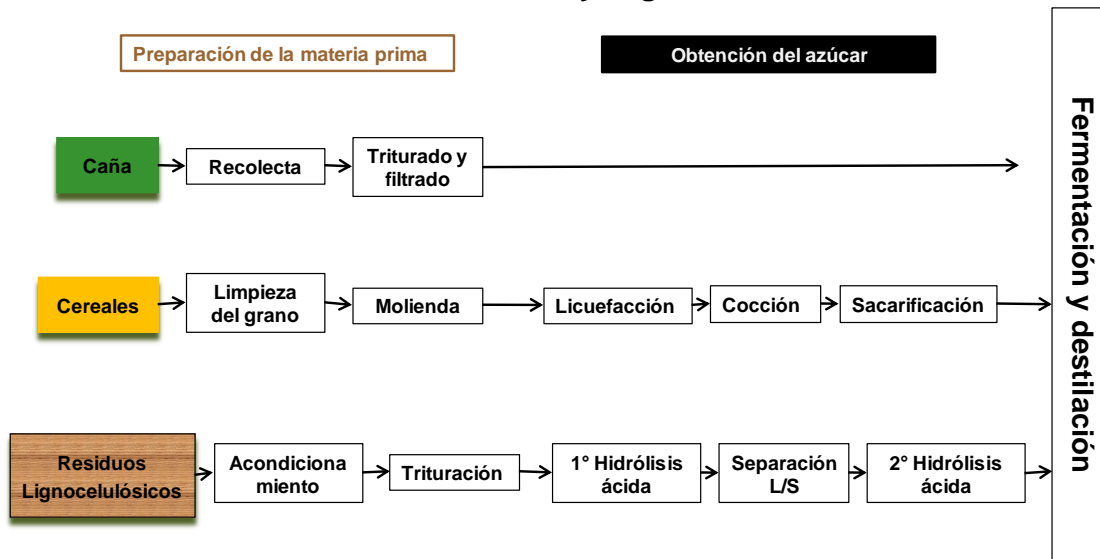


Figura 2: Esquema general de la producción de bioetanol (Budny, 2007).

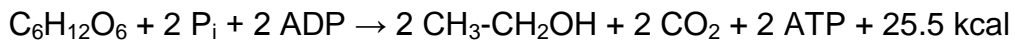
Básicamente el proceso cuando la materia prima es de origen vegetal o residuos de la misma, puede dividirse en las siguientes etapas:

**Preparación de la muestra:** En esta parte del proceso dependiendo de la materia prima de que se trate, se recolecta, se limpia, se acondiciona, se tritura o se muele, para prepararla y poderla llevar al paso siguiente.

**Conversión:** Es el proceso de transformación del almidón o celulosa en azúcares fermentables, lo cual involucra una hidrólisis, utilizando extractos enzimáticos, y/o por el tratamiento químico a través de una hidrólisis ácida.

**Fermentación:** La fermentación alcohólica es un proceso anaerobio, realizado básicamente por levaduras. La fermentación alcohólica puede describirse como una glicólisis, de tal forma que puede verse cómo participa inicialmente una molécula de hexosa:





La vía metabólica de producción de etanol se conoce como vía *Embden-Meyerhof-Parnas*, en la cual a partir de una molécula de glucosa se producen dos moléculas de etanol (Figura 2).

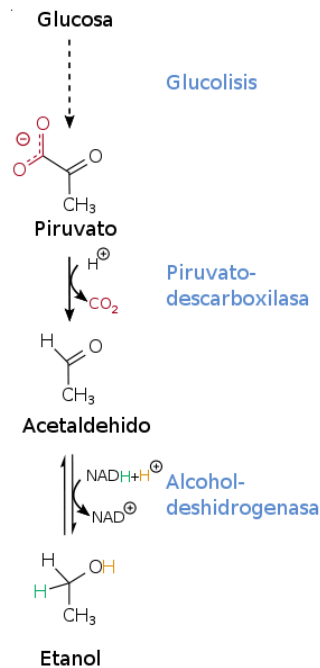


Figura 3: Vía metabólica *Embden-Meyerhof-Parnas*

**Destilación o Deshidratación:** La destilación es la operación de separar, mediante calor, los diferentes componentes líquidos de una mezcla (etanol/agua). Una forma de destilación conocida desde la antigüedad, es la obtención de alcohol aplicando calor a una mezcla fermentada. Sin embargo para el caso del bioetanol es importante mencionar que la destilación para poder separar la mezcla etanol/agua es complicada y que la mezcla es azeotrópica y por lo tanto las condiciones de la destilación dependerán de la eficiencia de la fermentación.

El número de pasos del proceso dependerá de la materia prima así como de la calidad de la misma (Budny, 2007). Esto significa que de acuerdo a la materia prima para la producción de etanol se requerirán mayor o menor número de pasos en el proceso. Además de la

materia prima es importante considerar que la fermentación de azúcares se realiza generalmente por levaduras, en un tiempo aproximado de 48 h y se produce etanol, bióxido de carbono y otros compuestos indeseables como el metanol, alcoholes superiores, ácidos y aldehídos. Es muy importante eliminar los subproductos de la fermentación así como el agua, cuyo proceso generalmente se realiza mediante una destilación azeotrópica, ya que el etanol no puede ser empleado en los motores si contiene alguna de estas sustancias, para ser empleado en motores se requiere una pureza del 99.5 al 99.9 % (Goettemoeller, 2007).

El empleo de residuos celulósicos tales como bagazo de trigo, caña, bambú entre otros, representa un gran potencial de fuente de azúcares (Aiello, 1996; Ahring, 1999; Aoyama, 1999; Abbi, 2006), sin embargo, este tipo de materia prima requiere de la hidrólisis de los compuestos lignocelulósicos, lo que involucra mayor número de pasos en el proceso, igualmente se producen compuestos tales como pentosas, que dificultan la fermentación. Así mismo, la recolección y el transporte de los residuos puede ser un factor limitante.

Otra alternativa para la producción de bioetanol es el empleo de cianobacterias o microalgas, una de las opciones sería fermentar el almidón que muchas de ellas producen como sustancia de reserva. La concentración de almidón se puede aumentar a través de la manipulación de los parámetros de cultivo de las microalgas, tales como concentración de bióxido de carbono, intensidad de luz, así como el diseño del fotobiorreactor (Posten, 2009). Otra forma de emplear microalgas es a través de la producción de azúcares fermentables, tales como sacarosa, xilosa, manosa, rafinosa, entre otras (Ranga, 2007; Fortman, 2008), los cuales pueden ser utilizados para producir bioetanol. Investigaciones aún más recientes reportan el uso de microalgas transformadas genéticamente capaces de producir directamente etanol, de hecho la Compañía Algenol Biofuels ha iniciado la construcción de plantas en Texas E.U.A, (Technology Review, 2009; Sustainable Biotechnol., 2009). Básicamente la Planta consiste en biorreactores semitransparentes conteniendo agua salada tratada, a la cual se le suministra bióxido de carbono y se espera que las microalgas sean capaces de producir hasta 400,000 L etanol al año. Esta misma compañía se ha asociado con México's Sonora Fields, para la producción de bioetanol en México usando esta tecnología.

### **3.- Microalgas**

Las algas son organismos fotosintéticos, también llamadas tallophytas (plantas sin hojas ni raíces). Las algas se encuentran taxonómicamente separadas de las plantas, ya que presentan escasa diferenciación de tejidos. Según la clasificación Whittaker y Margulis (1978), algunas algas se encuentran en el reino protista junto con los protozoarios y el resto son organismos eucariotes que presentan una organización más específica y pertenecen al reino Plantae. De hecho, algunos organismos clasificados como algas se encuentran en la frontera con las plantas superiores y otras se encuentran en la frontera con los protozoarios (Richmond, 2004).

Las algas se encuentran generalmente en ambientes acuáticos dulces, salobres o salados; sin embargo, pueden encontrarse en ambientes extremos incluso en el desierto. Forman la base de la cadena alimentaria, produciendo materia orgánica a partir de la luz solar, bióxido de carbono y agua. Igualmente forman el oxígeno necesario para los organismos consumidores.

Las algas procariotas o cianobacterias no presentan membrana celular ni organelos diferenciados. Las algas eucariotas tienen membrana citoplasmática encargada del transporte y generalmente presentan pared celular compuesta por polisacáridos (Atlas, 1984).

#### **3.1 Cianobacterias**

Las cianobacterias comprenden un grupo grande y heterogéneo de organismos fototróficos oxigénicos procariotes (Madigan, 2006). Presentan diversidad de formas: unicelulares pluricelulares filamentosas, filamentosas ramificadas, no ramificadas, con heterocitos (células vegetativas diferenciadas que se encuentran regularmente a lo largo de un filamento o en un extremo del mismo). Los estudios taxonómicos recientes las dividen en cinco

grupos; unicelulares que se dividen por fisión binaria; unicelulares que se dividen por fisión múltiple; filamentosas con heterocitos, cuya función es la fijación de nitrógeno; filamentosas sin heterocitos y ramificadas (Tabla 3) (Lee, 2004; Madigan, 2006).

Tabla 3 Grupos, órdenes y géneros de las cianobacterias.

Grupo	Orden	Géneros
I. Unicelulares: células aisladas o agregados celulares	<i>Chroococcales</i>	<i>Gloecapsa</i> , <i>Gloeothece</i> , <i>Gloeobacter</i> , <i>Synechocystis</i> , entre otras
II. Pleurocapsaleano: reproducción por baeocitos producidos por fisión múltiple	<i>Pleurocapsales</i>	<i>Dermocarpa</i> , <i>Pleurocapsa</i> , <i>Dermocarpella</i> , <i>Myxosarcina</i> entre otros
III. Oscillatoriano: filamentos que se dividen por fisión binaria en un solo plano	<i>Oscillatoriales</i>	<i>Oscillatoria</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Arthrospira</i> , <i>Lyngbya</i> , entre otras
IV. Nostocaleano: filamentosas que producen heterocitos	<i>Nostocales</i>	<i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> ; <i>Calothrix</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Scytonema</i>
V. Ramificaciones celular	<i>Prochlorales</i>	<i>Fischerella</i> , <i>Stigonema</i> , <i>Chlorogloeopsis</i> , <i>Hapalosiphon</i>

Las dimensiones de las cianobacterias se encuentran en el intervalo de las bacterias típicas de 0.5- 1µm de diámetro hasta células grandes de 60µm, en especies como *Oscillatoria princeps*.

Las cianobacterias contienen generalmente ácidos grasos polinsaturados (dos o más dobles enlaces), lo cual las diferencia de otras bacterias, ya que éstas, en su mayoría contienen ácidos grasos monoinsaturados. La pared celular de las cianobacterias es una estructura fina que es semejante a la de las bacterias Gram-negativas, puede contener peptidoglicano, en algunos producen recubrimientos de mucilago, el cual permite agrupar células o filamentos. La membrana fotosintética es frecuentemente compleja y multilaminar, aunque en algunos casos de cianobacterias más simples las lamelas están arregladas regularmente en círculos concéntricos alrededor de la periferia del citoplasma. En cuanto a los pigmentos que producen las cianobacterias, solo contienen clorofila  $\alpha$ , y todas contienen biliproteínas características (ficobilinas), las cuales son empleadas como pigmentos adicionales en el proceso de la fotosíntesis. Una clase de esas ficobilinas es la ficocianina, la cual es de color azul y que conjuntamente con la clorofila le da el color característico a las algas verde-azules, otra ficobilina característica es la ficoeritrina de color rojo, y las especies que la contienen son de color pardo o rojo.

La nutrición de las cianobacterias es sencilla, generalmente no requieren vitaminas y utilizan nitratos o amonio como fuente de nitrógeno. Es común encontrar especies que fijan nitrógeno. La mayoría de las especies son fotoautótrofas obligadas, aunque algunas no muy comunes pueden crecer en pequeñas cantidades de fuente de carbono tales como glucosa y acetato en presencia de luz (heterótrofas). Algunas especies filamentosas pueden crecer usando glucosa u otros azúcares sencillos en la oscuridad, empleando la molécula orgánica como fuente de carbono y energía. Un gran número de cianobacterias realizan fotosíntesis anoxigénica y desarrollando únicamente el fotosistema I, cuando existen sulfuros presentes

en el medio. Algunos productos metabólicos de las cianobacterias tienen importancia práctica, tales como neurotoxinas, geosminas, proteínas lípidos y pigmentos.

### **3.2.- *Microalgas eucariotas***

El término alga se refiere a una gran diversidad de organismos eucariotes que contienen clorofila y llevan a cabo fotosíntesis oxigénica, son evolutivamente muy diferentes de las cianobacterias (Madigan, 2006).

Existen varios criterios para clasificar a las algas, uno puede ser el tipo de clorofila que producen, otro es la composición celular de la pared celular y las sustancias de reserva que producen. De acuerdo a estos criterios se agrupan en una división clase, orden, familia género y especie (Tabla 4) (Lee, 2004; Madigan, 2006).

Pueden ser unicelulares o coloniales, las cuales son agregados celulares, cuando las algas están dispuestas de extremo a extremo se les conoce como filamentosas. La mayoría de las algas son verdes debido a la presencia de clorofila; sin embargo, existen algunas rojas o pardas, las cuales además de la clorofila tienen otros pigmentos como carotenos. Las células de las algas contienen uno o más cloroplastos, que están compuestos de estructuras membranosas llamadas tilacoides donde se realiza la fotosíntesis.

Tabla 4. División taxonómica y propiedades de las microalgas.

División	Nombre común	Morfología	Pigmentos	Material de reserva	Pared celular	Habitat
Chlorophyta	Algas verdes	Unificadas o con ramificaciones	Clorofila a y b	Almidón, sacarosa	Celulosa	Agua dulce, suelos marinos
Euglenophyta	Euglenoides	Unicelular y flagelados	Clorofila a y b	Paramilon y glucano	No tiene	Agua dulce
Chrysophyta	Diatomeas y algas pardas	Unicelular	Clorofila a y c	Lípidos	En algunos sílice	Agua dulce suelo marino
Phaeophyta	Algas pardas	Filamentosa, parecida a las plantas	Clorofila a, c y xantofilas	Glucano y manitol	Celulosa	Marino
Pyrrophyta	Dinoflagelados	Unicelulares flagelados	Clorofila a y c	Almidón	Celulosa	Agua dulce o marina
Rhodophyta	Algas rojas	Unicelular filamentosas	Clorofila a y c, ficocianina y ficoeritrina	Floridean	Celulosa	Marino
Heterokontophyta	Café-doradas	Unicelular, biflagelada	Clorofila a y c. Fucoxantina	Chrysolaminarina, lípidos	Celulosa	Agua dulce y salada.

En la mayoría de las algas el pigmento principal es la clorofila a, sin embargo algunas de ellas contienen otros tipos de clorofila que son característicos de un tipo de alga en particular. Además de la clorofila, contienen otro tipo de pigmentos secundarios como carotenos, que pueden ser pardos o amarillos.

Todas las algas realizan fotosíntesis oxigénica, usando agua como donador de electrones. La mayoría de las algas son fotótrofas obligadas, es decir no pueden crecer en la oscuridad en presencia de compuestos orgánicos. Sin embargo, existen algunas algas que pueden ser

quimiorganotróficas y catabolizan azúcares simples en obscuridad, algunas de estas fuentes de carbono son el acetato, que también es empleado como fuente de energía, por algunas algas flageladas y chlorofitas. Incluso en algunos casos pueden asimilar compuestos orgánicos simples en presencia de luz, pero no pueden crecer empleándola como única fuente de energía.

Otra característica de las algas que puede ser usada para su clasificación es la naturaleza de los polímeros de reserva que sintetizan. Algas que pertenecen a la División *Clorofita*, producen almidón, en contraste algas de otros grupos producen otra variedad de sustancias de reserva, algunas poliméricas y otras como monómeros libres (Tabla 4) (Brock, 2006).

Las algas presentan una gran diversidad de estructuras y química en su pared celular. En muchos casos la pared celular está compuesta de arreglos fibrilosos de celulosa, usualmente modificadas por la adición de otros polisacáridos tales como pectina, xilanas, mananas, ácido algínico y ácido fucínico. En algunos casos, la pared celular contiene carbonato de calcio, lo cual la hace más fuerte, a este tipo de formas se les denomina coralinas o calcáreas. En los euglenoides la pared celular está ausente. En las diatomeas la pared está compuesta de sílice.

La pared celular de las algas es permeable a moléculas de bajo peso molecular, tales como agua, iones, gases y otros nutrientes. La pared celular de las algas tiene poros de 3 a 5 nm, los cuales permiten pasar moléculas con un peso molecular hasta de 15,000 (Barsati, 2006; Madigan, 2006).

Un cierto número de algas son móviles, usualmente debido a flagelos, los cuales consisten en un axonema de nueve microtubulos doblados que rodean dos microtúbulos centrales los cuales revisten la membrana plasmática. Dependiendo del grupo de algas, estas presentarán diferente número de flagelos, así las *Clorofytas* presentan dos o cuatro flagelos polares, las *Dinoflageladas*, pueden tener dos flagelos de diferente tamaño, y con diferente punto de inserción a la célula. En muchos casos las algas no son móviles, en estado vegetativo y forman gametos móviles sólo en la reproducción sexual.



Las algas se reproducen tanto sexual como asexualmente y muchas de ellas de ambas formas. En la reproducción asexual una célula da lugar a otras dos siendo la forma más sencilla la fisión binaria, seguida de la gemación y esporas; si estas últimas presentan flagelos se les conoce como zoosporas. En la reproducción sexual, se combina el material genético de dos células, la forma más sencilla de reproducción sexual es la conjugación donde dos células intercambian material genético.

Debido a la cantidad de ambientes en los que han sobrevivido las algas, su metabolismo, ha evolucionado para poderse adaptar a condiciones extremas. Algunos de los mecanismos que han desarrollado las algas para facilitar su adaptación incluyen la producción de algunas sustancias de interés comercial tales como proteínas, lípidos, carotenoides, y azúcares. Así se encuentran productos de algas en el mercado como la *Spirulina maxima*, que se ha empleado como suplemento alimenticio desde la época de los aztecas (Ciferri, 1983; Vonshak, 1997). Otras especies producen lípidos que pueden ser transformados posteriormente en biodiesel (Chisti, 2007) y el aprovechamiento de diferentes vías metabólicas para producir, hidrógeno, sacarosa, glucosa, manosa, etanol, butanol o propanol a través del manejo de estrés metabólico y manipulación genética (Fortman, 2008).

### **3.3. Producción a gran escala de productos a partir de microalgas**

Las algas pueden ser empleadas como fuente de biocombustibles ya que éstas producen sustancias tales como lípidos (biodiesel), hidrógeno, biogás y azúcares (bioetanol) (Fischer, 2008). La idea de emplear las algas como fuente para la producción de biocombustibles no es nueva, de hecho se estudió desde los años ochentas, sin embargo en la última década ha resurgido por el alza en los precios del petróleo, y aún más significativamente por la preocupación del calentamiento global asociado a la quema de combustibles fósiles (Chisti, 2007).

La obtención de productos provenientes de algas actualmente está limitada, ya que las bases tecnológicas para lograr cultivos en continuo, la optimización de producción de biomasa así como los procesos de separación de los productos aún no son económicamente viables en muchos casos, por lo que el reemplazo de los combustibles fósiles por estas nuevas tecnologías con algas aún se encuentra en desarrollo (Posten, 2009).

En lo que respecta al biodiesel y bioetanol, la competencia directa son los cultivos agrícolas tales como palma, soya, canola, maíz, trigo, y caña entre otros (Chisti, 2007). Una de las grandes ventajas del cultivo de microalgas sobre los cultivos agrícolas es que la producción de biomasa de microalgas por metro de superficie es hasta 100 veces mayor que los cultivos agrícolas (Chisti, 2007; de la Vega, 2008). Se estima que para producir a partir de cultivos agrícolas la mitad del diesel que se requiere para transporte en Estados Unidos, sería necesario ocupar alrededor del 400% del área de cultivo del mismo país, dependiendo de la materia prima agrícola seleccionada, lo cual es imposible (Chisti, 2007). Esto representa una gran ventaja para el empleo de las microalgas en este campo.

Uno de los factores que es necesario optimizar en los procesos de producción de microalgas es el rendimiento de biomasa. Generalmente es más caro producir biomasa de microalgas, que cultivos agrícolas. El crecimiento de organismos fotosintéticos requiere luz, dióxido de carbono, agua y sales inorgánicas, además de una temperatura entre 20 y 30°C. En cuanto a las sales estas pueden ser suministradas a través del uso de agua de mar enriquecida con fertilizante de fósforo y nitrógeno comerciales, este tipo de medio se puede emplear para algas marinas (Chisti, 2007); otra alternativa sería crecer las algas en aguas residuales (Posten, 2009).

Estos parámetros, tales como medios de cultivo, temperatura e incluso irradiación solar, pueden ser controlados gracias al uso de reactores, en cambio para los cultivos agrícolas, los factores dependen de la combinación de parámetros geográficos y del tipo de vegetación, la disponibilidad de agua y la radiación solar; de hecho los cultivos agrícolas son un proceso no contínuo con una eficiencia fotosintética de alrededor del 1 %, siendo que las microalgas alcanzan eficiencias del 5 % (Posten, 2009).

La producción a gran escala de biomasa microalgal, generalmente es en continuo y con radiación solar. Con este método de operación, el cultivo se alimenta continuamente y se retira la misma cantidad de cultivo; la alimentación se detiene durante la noche, pero la agitación es constante, alrededor del 25% de la biomasa que se produce durante el día, se pierde durante la noche por el proceso de respiración, sin embargo, la cantidad de biomasa perdida, dependerá del cantidad de iluminación y la temperatura. Los únicos sistemas eficientes para producir microalgas son los reactores de carrusel (race way) y los fotobiorreactores (Terry, 1985; Molina, 1999).

Los reactores de carrusel son estanques construidos con un canal que recircula en forma de bucle, donde la recirculación y el mezclado se produce por aspas y el flujo es guiado a través del canal. Se pueden construir de concreto, tierra compacta recubierta de plástico o dependiendo del tamaño, de fibra de vidrio. Existe una gran experiencia en el diseño de este tipo de reactores desde los años 1950's. La temperatura fluctúa de acuerdo al clima y puede haber pérdidas importantes por evaporación, presenta un mezclado pobre y zonas oscuras, sin embargo es menos costoso que los fotobiorreactores.

Los fotobiorreactores permiten el cultivo de microalgas puras o monocultivos. Han sido empleados a gran escala. Un fotorreactor tubular consiste en un arreglo de tubos transparentes generalmente fabricados en plástico o vidrio. En el arreglo tubular o en el colector solar se captura la luz solar. El diámetro de los tubos está limitado por la transferencia de luz. El cultivo microalgal es alimentado hacia el colector solar y regresa a un contenedor. El colector solar debe ser orientado para maximizar la transferencia de luz solar, generalmente los tubos se encuentran paralelos entre sí. Puede emplearse iluminación artificial puede emplearse, sin embargo esto aumenta los costos. Puede ser alimentado con CO<sub>2</sub> si es necesario, lo cual podría contribuir para el control del pH y la fotosíntesis, es necesario implementar un sistema de degasificación ya que el oxígeno que se produce en el sistema, en concentraciones mayores a la saturación puede inhibir la fotosíntesis. Se puede controlar la temperatura si es necesario para la optimización de la producción de la biomasa. La selección de alguno de estos biorreactores dependerá del valor del producto final así como de los requerimientos del cultivo microalgal (Chisti, 2007; Posten, 2009).

Un factor importante a considerar es que una vez que se ha logrado obtener la biomasa para el producto deseado, ésta puede ser aprovechada de manera integral, es decir puede tener subproductos de alto valor agregado, como proteína, carotenos o incluso como biomasa convencional. Otro parámetro flexible en cuanto a las microalgas, es que la planta productora puede aprovechar gases de desecho de otras actividades industriales, por ejemplo se puede instalar una planta productora de biodiesel adyacente a una refinería de petróleo y alimentar la primera con los gases que se eliminan a la atmosfera de ciertas plantas de la refinería y aprovechar el CO<sub>2</sub> disminuyendo los gases invernadero (de la Vega, 2008).

El mejoramiento de los procesos tecnológicos y diseños de sistemas integrados para el suministro de subproductos generados por los cultivos de microalgas, permitirá optimizar la relación costo-beneficio en la producción.

#### **4. Osmorregulación**

El océano es el medio donde la mayoría de las cianobacterias y algas, fotótrofas oxigénicas existen, donde el contenido de cloruro de sodio es de alrededor de 35 g/L, como consecuencia de esto, el fitoplancton marino debe estar adaptado a la vida en un ambiente salino. Existen incluso algas que son capaces de adaptarse a vivir en concentraciones hasta de 300 g/L como en el Mar Muerto (Oren, 2002).

Todos los organismos que viven en una solución salina, incluyendo el fitoplacton marino, requieren ajustar el citoplasma, para que se encuentre en equilibrio osmótico con el medio exterior. Más aún en ambientes donde la salinidad es variable, las algas deben adaptarse a dichas fluctuaciones de salinidad. En especies que no poseen una membrana rígida, la adaptación puede realizarse a través del aumento o disminución del tamaño la célula transportando agua a través de la membrana.

Para procurar el balance osmótico ninguno de los organismos fotótrofos oxigénicos conocidos acumula sal en concentraciones iguales a las del medio externo, de hecho la

estrategia de acumulación de sal es un mecanismo de osmotolerancia empleado por muy pocos microorganismos, solo alguno de la familia de Halobacteriaceae y unas pocas bacterias heterótrofas. Este grupo de microorganismos emplea KCl para contrarrestar la presión osmótica ejercida por el medio externo, donde predomina el NaCl. En estos microorganismos, todos sus sistemas enzimáticos internos deben estar activos en la presencia de concentraciones iónicas altas. Otros microorganismos halófilos o halotolerantes, acumulan solutos orgánicos, para equilibrar la presión osmótica de la célula respecto al entorno. Estos solutos son generalmente llamados: solutos compatibles, los cuales permiten que la actividad enzimática no se inhiba aún a altas concentraciones de sal.

Los organismos halotolerantes y halófilos fototróficos oxigénicos, ya sean eucariotes o procariotes, producen una gran variedad de solutos orgánicos compatibles (Tabla 5) (Oren, 2007).

Los osmorreguladores o solutos compatibles, son en su mayoría compuestos orgánicos de bajo peso molecular, sin carga neta, que a pesar de acumularse dentro de la célula no interfieren con el metabolismo de la misma y tienen como función principal reducir el potencial osmótico y aparentemente ayudan a las macromoléculas a mantener su configuración original (Hershokovitz, 1991; Mikkat, 1997).

Tabla 5. Grupos representativos de algas y cianobacterias halotolerantes y halófilas y los solutos compatibles que acumulan en respuesta a la concentración de sal en su ambiente.

<b>Grupo Taxonómico</b>	<b>Género</b>	<b>Principal compuesto acumulado</b>
Cianobacterias	<i>Synechococcus</i> ; <i>Scynechocystis</i> ; <i>Microcoleus</i> ; <i>Halothece</i>	Sacarosa, trehalosa, glucosilglicerol
Rhodophyceae	<i>Hypenea</i> , <i>Iridophycus</i> , <i>Lomentaria</i> , <i>Phorphyra</i> , <i>Rhodymenia</i> , <i>Corallina</i> , <i>Grateloupia</i>	Floridosida, digenasida, sulfóxido de N-meti-L- metionina, ácido isetiónico
Chrysophyceae	<i>Monochrysis</i> , <i>Poteriochromonas</i>	Ciclohexanetetrol, isofloresida
Eustigmatophyceae	<i>Monallantus</i>	Mannitol, prolina
Phaeophyceae	<i>Ascophyllum</i> , <i>Colpomenia</i> , <i>Dictyota</i> , <i>Ecklonia</i> , <i>Fucus</i> , <i>Pylaiella</i> , <i>Scytosiphon</i> , <i>Pelvetia</i> , <i>Hormosira</i>	Manntol, y algunas veces otros poli-alcoholes.
Prasinophyceae	<i>Platymonas</i> , <i>Pyramimonas</i> <i>Asteromonas</i>	Manitol glicerol
Bacillariophyceae	<i>Cyclotella</i> , <i>Navicula</i> , <i>Cylindrotheca</i>	Prolina manosa
Chlorophyceae	<i>Dunaliella</i> , <i>Chlamydomonas</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Cladophora</i> , <i>Klebsormidium</i> , <i>Stichococcus</i> , <i>Ulva</i>	Glicerol, prolina, sacarosa, glicil-betaína, sorbitol, prolina, dimetilsulfoniopropionato, prolina

En el caso de las cianobacterias existe una correlación entre la tolerancia a la sal y el tipo de osmorregulador que producen; así, las especies de agua dulce tienden a producir disacáridos, las especies halófilas acumulan glicin-betaína y aquellas especies que crecen en salinidades medias (aguas salobres), generalmente producen glucosil-glicerol.

Únicamente en las especies *Synechocystis*, *Lyngbya* y *Anabaena* se ha encontrado que producen dimetilsulfoniopropionato (DMSP) (Reed, 1983).

En el caso de las microalgas, la variedad de compuestos osmorreguladores es aún mayor que en las cianobacterias (Ben-Amotz, 1983). Se pueden reconocer clases de osmorreguladores: heterosidos (floridosido, isofloridosidos, digenosidos), alcoholes polihídricos (glicerol, manitol, sorbitol, ciclohexanetetrol), azúcares simples (manosa), aminoácidos (prolina) y aminoácidos derivados (DMSP, N-metil-L-metionina sulfónico). Sin embargo, se han detectado otro tipo de moléculas en especies específicas (Oren, 2007).

La presencia de ciertos osmorreguladores está correlacionada con la posición taxonómica del organismo. Los heterosidos floridosidos (galactopiranosilglicerol), L-isofloridosido y el D-isofloridosido, los sintetizan las Rhodophyceae y Chrysophyceae (Reed, 1985). Los digenosidos ( $\alpha$ -D- mannopyranosil- (1-2) glicerato es un marcador taxonómico para el alga roja *Ceramiales* (Reed, 1990). Otra excepción bioquímica en términos de carbohidratos de gran tamaño como osmorreguladores, se presenta en géneros como *Bostrychia*, *Stictosiphonia* y *Caloglossa*, las cuales producen poli-alcoholes tales como sorbitol, dulcitol y manitol, que son muy comunes en las algas rojas. Los poli-alcoholes son comunes en las divisiones Phaeophyceae, Prasinophyceae y Chlorophyceae. Los azúcares simples y el glicerol son los solutos compatibles más encontrados en las algas. El aminoácido, prolina, se encuentra como regulador generalmente en combinación con otros productos, en muchas diatomeas y algas verdes (Ben – Amotz, 1983).

La mayoría de los solutos compatibles orgánicos en microorganismos oxigénicos fototróficos, contienen únicamente, carbón, oxígeno e hidrógeno. En el ambiente marino generalmente el nitrógeno está limitado y es por eso que los solutos que contienen nitrógeno, tales como aminoácidos y sus derivados, aparentemente solo se sintetizan por microorganismos adaptados a bajas salinidades. Por otro lado, el agua dulce contiene concentraciones bajas de sulfatos (23 mM), y es por esa razón que los osmorreguladores con azufre son generalmente sintetizados por algas que habitan ambientes salinos (Oren, 2007).

Es muy probable que existan aún un gran número de osmorreguladores aún no identificados, ya que las posibilidades de adaptarse de los organismos fototróficos oxigénicos es muy elevada y por tanto el problema de mantener el equilibrio osmótico igualmente debe presentar un gran número de posibilidades. Dentro de los osmorregulados más ampliamente distribuidos para especies de microalgas y cianobacterias con baja halotolerancia; se encuentran los azúcares simples tales como la sacarosa, glucosa y trehalosa (Figura 3.) (Blumwald, 1983; Los, 2004), En algunas especies tales como *Chlorella emersonii* y *Chlorella autothophica*, se ha encontrado que producen sacarosa y prolina (Ahmad,1984), en otros casos especies como en la cianobacteria *Scytonema* (Page-Sharp, 1999) se encontraron conjuntamente trehalosa y sacarosa como osmorreguladores después de un choque osmótico de 48 h con 150mM de cloruro de sodio. Para el caso de *Synechocystis* sp. PCC6803 únicamente se encontró sacarosa (Miao, 2003). La producción de azúcares simples como osmorreguladores, está ampliamente distribuida en la naturaleza.

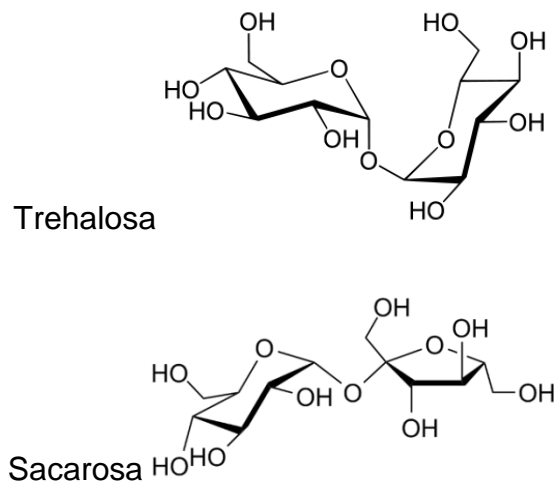


Figura 4. Estructura de la trehalosa y sacarosa.



Los azúcares simples se producen a través del proceso de fotosíntesis, cuya reacción simplificada es (Campbell, 2002):



Los azúcares se producen en la fase oscura de la fotosíntesis través del ciclo de Calvin, donde las moléculas de ATP y NADPH, producidas en la fase luminosa reducen el dióxido de carbono a azúcares (hexosas), las cuales posteriormente a través de una serie de reacciones que utilizan UDP-glucosa como producto intermedio, conllevan a la síntesis de disacáridos tales como la sacarosa y la trehalosa (Lehninger, 2004).

### **III OBJETIVOS:**

#### ***Objetivo General***

Determinar el efecto del estrés osmótico en la producción de azúcares fermentables en microalgas.

#### ***Objetivos particulares:***

1. Aislar microalgas que presenten mecanismos de acumulación de osmorreguladores principalmente azúcares.
2. Establecer el efecto de la salinidad en el crecimiento de las microalgas aisladas.
3. Determinar el efecto de la concentración de sal en el medio y el tiempo de choque osmótico en la producción de azúcares.
4. Determinar la factibilidad de utilizar los azúcares producidos para la fermentación alcohólica.

### **IV HIPÓTESIS**

La producción de azúcares fermentables por microalgas se puede incrementar como respuesta al estrés osmótico.

## V MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1. *Estrategia metodológica.*

La estrategia metodológica básicamente consistió en la toma de muestras, aislamiento y selección de algas productoras de azúcares, pruebas de crecimiento a diferentes salinidades, y efecto del choque osmótico en la producción de azúcares y finalmente determinación de osmorreguladores (Fig. 5).

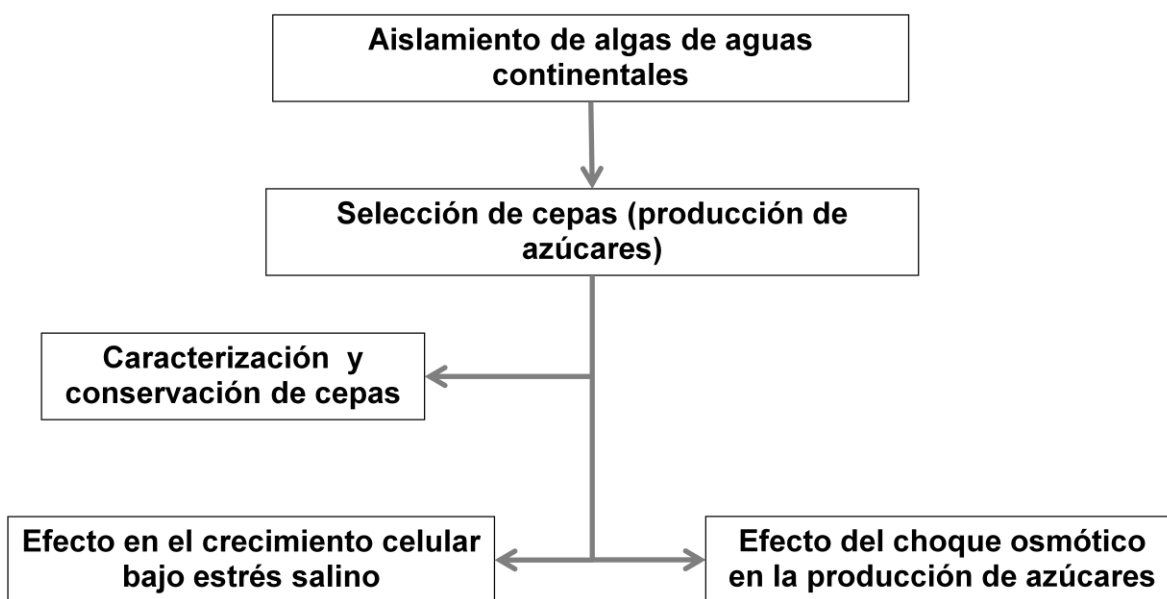


Figura 5. Estrategia metodológica

### 2. *Aislamiento de microalgas a partir de aguas continentales*

#### 2.1 *Sitios de muestreo.*

Se muestreo en 12 sitios constituidos por lagos, lagunas, esteros, mar y ríos, todos ellos buscando diferentes hábitat y concentraciones salinas. De todos ellos solo se describen los cuatro sitios de donde se asilaron las microalgas empleadas en el estudio: Lago de Texcoco, Lago de Guadalupe, un lago en Tabasco y el río Tamesi en Ontario, Canadá.

El área denominada como Lago de Texcoco se encuentra en el nororiente de la zona metropolitana de la ciudad de México. Aunque actualmente no todo es un lago, la salinidad del sitio es muy alta, tanto en el suelo como el Lago Nabor Carrillo y las lagunas de estabilización, las cuales se encuentran dentro del área. El Lago de Guadalupe es un lago situado al norponiente del área metropolitana de la ciudad de México y en realidad es una presa. El lago de Tabasco está en una zona que según la marea puede ser bañada por el mar esporádicamente. Finalmente el río Tamesi, se localiza en la provincia de Ontario en Canadá, es un río que proviene de los Grandes Lagos y las muestras se tomaron en la ciudad de London. Las muestras se tomaron en frascos y en el momento de llegar al laboratorio de determinó pH y conductividad de acuerdo a la NOM-AA-44.

## **2.2 Medios de Cultivo.**

El enriquecimiento de las muestras se realizó en diferentes medios de cultivo de acuerdo al origen de la muestra: BG 11, BG11 con NaCl, 25 g/L y Guillard F/2 (Rippka, 1979; Steinn, 1973) La composición de cada medio fue:

- a) Medio BG11 (g/L):  $\text{NaNO}_3$ , 1.5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.04;  $\text{MgSO}_4$ , 0.075;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.036; EDTA, 0.001;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.02; Acido cítrico, 0.006; Citrato férrico amoniacal, 0.006 . Solución de metales trazas (g/L):  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2.86;  $\text{MnCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.81 g/L;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.39;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.079;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ , 0.0494. De la solución de metales trazas se añade 1mL/L de Medio BG11.
- b) Medio BG11 NaCL 25 g/L: a la solución anterior se le añadieron 25 g/L de NaCl.
- c) Medio Guillard F/2: Solución básica de nutrientes (mg/L):  $\text{NaNO}_3$  , 75;  $\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 5;  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , 30. Solución de metales traza:  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 4.36 g/L;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 3.15 g/L; 1 mL de una solución  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 9.8 g/L; 1 mL solución  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 22 g/L; 1 mL solución  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 g/L; 1 mL solución  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 180 g/L; i mL solución  $\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 63 g/L. Solución de vitaminas: Cianocobalamina (B12), 0.001 g/L; Tiamina. HCl (B1), 0.02 g/L;. Por cada litro de agua salada a ser enriquecida ( $\text{NaCl}$  0.35 M), con los nutrientes básicos, se le añade 1 mL de solución de metales trazas y 0.5 mL de solución de vitaminas.

### **2.3. Condiciones de cultivo**

Los cultivos sumergidos se llevaron a cabo en matraces de 250 mL, con un volumen de operación de 150 mL, con aireación a un flujo de 4vvm y con foto periodos 12:12 de 100  $\mu\text{mol fotonos/m}^2\text{s}$ , para lo cual se emplearon lámparas fluorescentes de luz blanca de 32 W (T32) y temperatura ambiente durante 15 días.

Los reactores eran matraces Erlen-Meyer de 250 mL adaptados con tapones de hule, con tres puertos. Uno para la aireación al cual se le adaptó un tubo de vidrio para llegar al fondo del matraz y distribuir uniformemente la aireación. Otro puerto era de muestreo y el tercero de venteo para poder equilibrar la presión del suministro de aire

### **2.4. Aislamiento**

De cada muestra tomada, se inocularon 10 mL en fotorreactores, cada muestra se sembró en los tres medios de cultivo (punto 2.2) y en las condiciones mencionadas en el punto 2.3. Después de dos resiembras, se procedió al aislamiento por siembra en placa (medio de cultivo en el que presentó mayor crecimiento con agar-agar, 15 g/L). Las placas se sometieron a fotoperiodos de 12:12 con 100  $\mu\text{mol fotonos/m}^2\text{s}$ , durante 10 días.

Las cepas con mejor crecimiento se aislaron por dilución en placa, en medio BG11, BG11 salino o Guillard, se sembraron 20  $\mu\text{l}$  del cultivo, el cual se extendió uniformemente en la placa y se expusieron a fotoperiodos de luz 12:12 durante 15 días. Posteriormente, a partir de las colonias aisladas se hicieron cultivos sumergidos bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente de aireación, periodos de luz (sección 2.3), con el objetivo de emplearlo como inóculo para las pruebas de cinéticas de crecimiento posteriores.

Las cepas seleccionadas se caracterizaron por microscopía óptica, con un microscopio Leica DMLB. Cada cepa fue observada y comparada con índices taxonómico de algas (Bourrelly, 1996). Este trabajo se realizó en el laboratorio de biología de microalgas de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la asesoría de la Dra. Ma. Esther Meave.

### **3. Cinéticas de crecimiento.**

Matraces de 250 mL con un volumen de operación de 150 mL del medio BG11, se inocularon con 10% de pre-cultivo de la microalga pura (sección 2.4); posteriormente se cultivaron durante 15 días en las condiciones de aireación e iluminación anteriormente mencionadas. El crecimiento fue monitoreado cada 24 h, para lo cual se tomaron 6 mL de muestra y se le determinó peso seco y densidad óptica a 600.nm. Igualmente se llevó a cabo control de la pureza de la cepa por microscopía óptica.

Para la determinación de peso seco se filtraron 5 mL de muestra a través de una membrana de tamaño de poro de 0.42  $\mu\text{m}$ , a peso constante, posteriormente la muestra se puso en una estufa a 80°C durante 24 h y finalmente se pesó. Para la Densidad Óptica (DO. 600 nm) se midió la absorbancia a 1 mL de muestra, la cual se transfirió a una celda de 1.5 mL y se midió la absorbancia a 600 nm, empleando como blanco el medio de cultivo. Las determinaciones se realizaron en un colorímetro Genesis 10 UV, por triplicado. Cada prueba se realizó por triplicado

Al final de cada cinética se determinaron azúcares totales intra y extracelulares como se indica a continuación (inciso 4)

### **4. Análisis de carbohidratos intra y extracelulares.**

La biomasa del cultivo fue recuperada por centrifugación a 5,000 rpm durante 20 min a 4°C, en una centrifuga Beckman J2-MC.El sobrenadante se separó y se le determinaron azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico (Dubois, 1956).

La biomasa se liofilizó durante 48 h, en un equipo Labconco 6Plus, a 3.0 Pa y el colector a -83 °C. La biomasa seca (15-5 mg), se resuspendió en 10 mL de etanol al 70%, en una concentración de 40 g/L.; y se dejó a 65°C durante 4 h en un estufa. Posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min empleando una centrifuga Sorvall Biofuge primo, el sobrenadante se recuperó y transvasó a un tubo falcón de 50 mL; evaporó hasta sequedad a

40°C, (tres días) (Müller, 1994). El producto obtenido se resuspendió en 10 mL de agua Milli Q para determinación de azúcares totales por el método de Dubois (Dubois, 1956).

Los azúcares se identificaron por HPLC. Cada fracción intra y extracelular, fue desionizada empleando una resina Bio-Rad 501 X8 de lecho fluidizado, cuyo capacidad era de 1.69 meq/g, por lo que la cantidad empleada dependía de la Molaridad del NaCl que tenía cada muestra. La resina junto con 15 mL de la muestra se sometió a agitación durante 24 h. Finalmente la muestra se filtró a través de un microfiltro de 22 µm antes de ser inyectada. Se empleó un HPLC Varian 9002 con detector de índice de refracción, una columna Phenomex REYEX empacada con una fase orgánica 300X7.8 75985 00H-0138-KO, y con una fase móvil H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1L/0.33 mL) y con flujo de 0.3 mL/min. Para la identificación de cada azúcar se emplearon estándares de sacarosa, trehalosa, glicerol marca Sigma y en el caso de etanol fue marca Baker.

##### ***5. Efecto del estrés salino en crecimiento y del choque osmótico en la producción de azúcares.***

Para las pruebas de efecto de la concentración de NaCl en el crecimiento, las microalgas aisladas se cultivaron en medio BG11 con NaCl 0.2, 0.4 y 0.6 M bajo las mismas condiciones mencionadas con anterioridad (sección 2.3). El crecimiento fue seguido por peso seco y densidad óptica a 600nm y los azúcares intra y extracelulares fueron determinados al final de la cinética, empleando para ello los métodos mencionados con anteriormente.

El efecto del choque osmótico sobre la producción de azúcares, se realizó estresando los cultivos ya crecidos (DO 600 nm = 1.5), adicionando directamente NaCl, hasta obtener concentraciones en el medio de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 M, los cultivos fueron posteriormente incubados en las mismas condiciones de luz, aireación y temperatura ya establecidos por tres días más. Los azúcares intra y extracelulares fueron determinados cada 24 h por el método de Dubois así como la identificación mediante HPLC, igualmente cada 24 h.(inciso 4).

## VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 1.- Aislamiento de microalgas a partir de aguas continentales

Se realizó el enriquecimiento de las 42 muestras provenientes de diferentes ecosistemas y condiciones, en los diferentes medio utilizados, de las cuales asilaron 12 cepas 1.1, 2.2, 6, LG1, LG4, T9, T12, B, Pr, C1, C2, Tam2 (Tabla 6).

Tabla 6: Resultados de pH, salinidad, enriquecimiento y aislamiento de las muestras de cuerpos acuíferos.

Clave	Origen	pH	Salinidad ppm	Medio de cultivo	Crecimiento en placa	Biomasa g/L
1.1	Texcoco	7.4	2138	BG11	+++	2.56
1.2	Texcoco	9.1	2169	BG11	-	
2.1	Texcoco	7.7	nd	BG11	+	
2.2.	Texcoco	7.6	nd	BG11	+++	2.16
3.1	Texcoco	9.2	nd	BG11	-	
3.2	Texcoco	9.9	nd	BG11	-	
4	Texcoco	10.9	2,229	BG11	-	
5	Texcoco	10.6	nd	BG11	-	
6	Texcoco	10.3	2,260	BG11	++	1.76
7	Texcoco	11.7	nd	BG11	-	
8	Texcoco	10.2	nd	BG11	++	1.74
9	Texcoco	10.2	nd	BG11	-	
LG1	Lago de Guadalupe	7.2	0.02	BG11	++	0.6
LG2	Lago de Guadalupe	7.1	0.05-	BG11	-	
LG3	Lago de Guadalupe	7.6	0	BG11	-	
LG4	Lago de Guadalupe	7.1	0	BG11	+++	1.36
T1	Zacatal, Tabasco	7.7	70	Guillard	++	
T2	Tabasco jardín botánico	6.1	63.2	Guillard	-	
T3	Tabasco Estero	7.3	76	Guillard	+	
T4	Tabasco Mar Roca	7.8	70	Guillard.	-	
T5	Tabasco Mar Puerto	7.7	73.6	Guillard	-	



	Real					
T6	Tabasco Zacatal Rio	7.2	67.4	Guillard	-	
T7	Tabasco Playa Profepa	7.1	72.2	Guillard	-	
T8	Estero Playa Profepa	7.7	74.3	Guillard	-	
T9	Tabasco Mar	6.82	73.4	BG11 NaCl	+	0.64
T10	Tabasco Laguna Ilusiones	6.7	0.26	Guillard	+	
T11	Tabasco Río Cañizal	8.2	0.3	Guillard		
T12	Laguna del Camarón	8.3	0.28	BG11	++	0.32
Z	Cepa pura Tabasco	nd	nd	BG11 NaCl	+	
B	Cepa pura de Tabasco	nd	nd	BG11 NaCl	+	0.46
Pr	Cepa pura de Tabasco	nd	nd	BG11 NaCl	+	0.53
C	Cepa pura tabasco	nd	nd	BG11 NaCl	-	
C1	Canada Río Tamesis	6.8	0.51	BG11	++	1.58
C2	Canada Rio Tamesis,	6.5	0.51	BG11	+	1.24
C3	Canada , Río Tamesis,	6.7	0.48	BG11	-	
Tam1	Oaxaca	7.8	8.63	BG11	++	
Tam2	Oaxaca	8.0	8.77	BG11	++	1.18
Tam3	Oaxaca	nd	nd	BG11	++	
Tam4	Oaxaca	7.4	4.66	BG11	++ -	
Tam5	Oaxaca			Guillard	+ colonias aislada	
Tam6	Oaxaca			BG11		

Nd =no determinado.

## **2. Identificación y cinéticas de crecimiento de las cepas aisladas.**

Las cepas que mostraron mayor crecimiento en medio líquido, se caracterizaron por microscopía óptica para conocer el género al que pertenecía cada una de ellas. Tres de las cepas aisladas fueron cianobacterias y las 9 restantes microalgas eucariotas (Tabla 7), todas ellas crecieron en BG11, a pesar de que este medio generalmente se usa para cianobacterias de agua dulce, de aguas termales y para algunas especies de algas marinas (Rippka, 1979), recientemente se ha encontrado que también puede ser adecuado para el crecimiento de microalgas eucariotes tales como las del género *Trebouxia humicola* (Shilpkar, 2010), *Scenedesmus* sp LX1 (Xin 2010), *Chlamydomona* y *Chlorella* (Deng, 2011), entre otras.

Al realizar las pruebas de cinéticas de crecimiento de las 12 cepas aisladas, el máximo crecimiento en orden creciente lo presentaron: un primer grupo A conformado por *Lyngbya*, *Cystecococcus*, *Synechocystis*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, y *Oscillatoria*; presentando concentraciones de biomasa final mayores a 1 g de biomasa ps/L (Fig. 6A y 6B). Un segundo grupo B de cepas fue: *Gloecapsa*, *Chlorella* (T), *Trebouxia*, *Nodularia*, y *Chrysothrix* mostraron menor crecimiento (<1), lo cual fue aproximadamente 50% menor que *Lyngbya* (Fig. 6C). En cuanto a la velocidad específica de crecimiento el valor más elevado lo presentaron *Lyngbya*, *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Synechocystis* (T), con valores superiores a  $0.4 \text{ h}^{-1}$ , estos valores muestran que el medio BG11 es favorable para el crecimiento de dichas cepas. La diferencia entre los grupos A y B, en cuanto a los valores de biomasa final y velocidad de crecimiento puede deberse a las condiciones en que se llevaron a cabo los cultivos ( $25^\circ\text{C}$ , 4vvm,  $100 \mu\text{moles fotones}/\text{m}^2\text{s}$ ); las cuales no son necesariamente las mejores condiciones de cultivo para cada cepa aislada. La  $\mu_{\text{max}}$ , de cada especie varía con las condiciones ambientales como la temperatura y cantidad de luz. Por ejemplo, en el caso de *Chlorella stigmatophora* al crecerla a  $25^\circ\text{C}$  y  $66 \mu\text{moles de fotones}/\text{m}^2\text{s}$ , presentó una  $\mu_{\text{max}}$  de  $0.78 \text{ h}^{-1}$ , cuando la luz se disminuyó a  $33 \mu\text{moles de fotones}/\text{m}^2\text{s}$ , a la misma temperatura, el valor de  $\mu_{\text{max}}$  disminuyó a  $0.56 \text{ h}^{-1}$ ; a  $10^\circ\text{C}$  la  $\mu_{\text{max}}$  disminuyó a  $0.36$  y  $0.24$  respectivamente (Aquatext, 2000). En el caso de *Scenedesmus*, la producción de biomasa, la velocidad específica de crecimiento así como la morfología se ven afectadas por el tipo de luz:

con luz blanca, azul, amarilla y roja, la velocidad de crecimiento varió 0.121, 0.258, 0.243 y 0.259 h<sup>-1</sup> respectivamente (Alvarez, 2010).

Tabla 7. Identificación, lugar de origen, biomasa producida y factor de eficiencia de las algas aislada.

Orden y Género	Lugar de origen	Máxima biomasa (g/L)	* $\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )
<i>Oscillatoriales Lyngbya</i>	Lago de Texcoco	2.56	0.928
<i>Chroococcales Cistococcus</i>	Lago de Texcoco	1.76	0.126
<i>Chroococcales Synechocystis</i>	Lago de Texcoco	1.74	0.301
<i>Chlorococcales Scenedesmus</i>	Río Tamesi, Canadá	1.58	0.479
<i>Chlorococcales Chlorella</i>	Lago de Guadalupe	1.36	0.628
<i>Oscillatoriales Oscillatoria</i>	Río Tamesi Canadá	1.24	0.313
<i>Chroococcales Synechocystis (T)</i>	Lago en Tabasco	1.18	0.413
<i>Chlorococcales Trebouxia</i>	Lago de Guadalupe	0.786	0.386
<i>Chlorococcales Chlorella (T)</i>	Lago en Tabasco	0.64	0.037
<i>Nostocales Nodularia</i>	Lago de Texcoco	0.16	0.346
<i>Chrysothraeraceae Chrysothraera</i>	Lago en Tabasco	0.32	0.214
<i>Chroococcales Gloeocapsa</i>	Lago en Tabasco	0.169	0.269

$\mu_{max}$  a 25 °C, medio de cultivo BG11, aireación 4 vvm e intensidad de luz de 100 $\mu$ moles de fotones/m<sup>2</sup>s

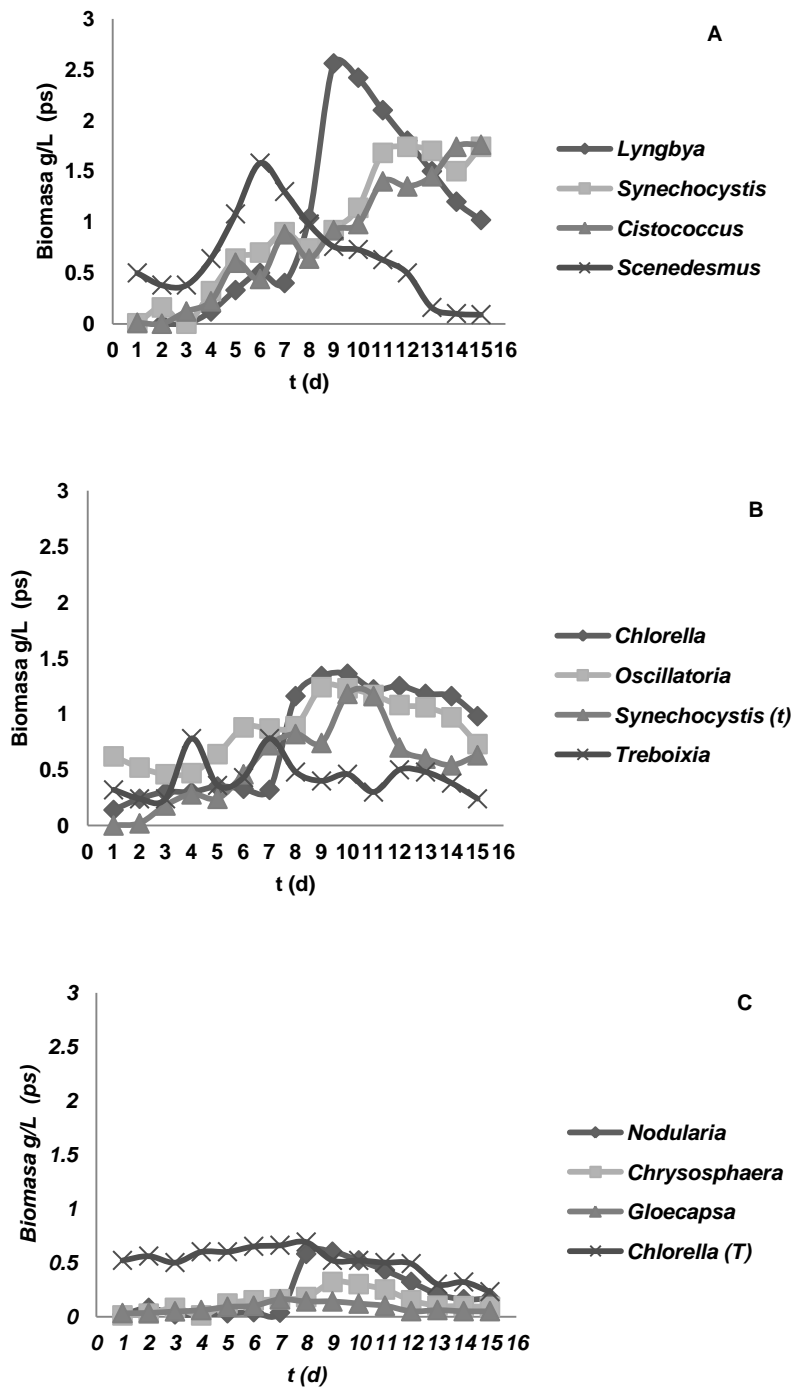


Figura 6. Cinéticas de crecimientos de las cepas aisladas en medio BG11.

### 3. Producción de azúcares intra y extracelulares de las cepas aisladas.

Para cada una de las 12 cepas aisladas se determinó el contenido de azúcares totales intra y extracelulares después de 15 días de crecimiento, en las mismas condiciones que se determinó la cinética.

Las cepas que presentaron la mayor producción de azúcares totales fueron. *Chlorella* (23.64 mg/g p.s.), *Trebouxia* (17 mg/g p.s.), *Chrysothrix* (13.03 mg/g p.s.), *Synechocystis* (T)(14.3 mg/g p.s.), aunque esta última presentó mayor producción de azúcares extracelulares que intracelulares y *Scenedesmus* (5.48 mg/g ps). La mayoría de las cepas presentaron mayor concentración de azúcares intracelulares que extracelulares (Fig. 7).

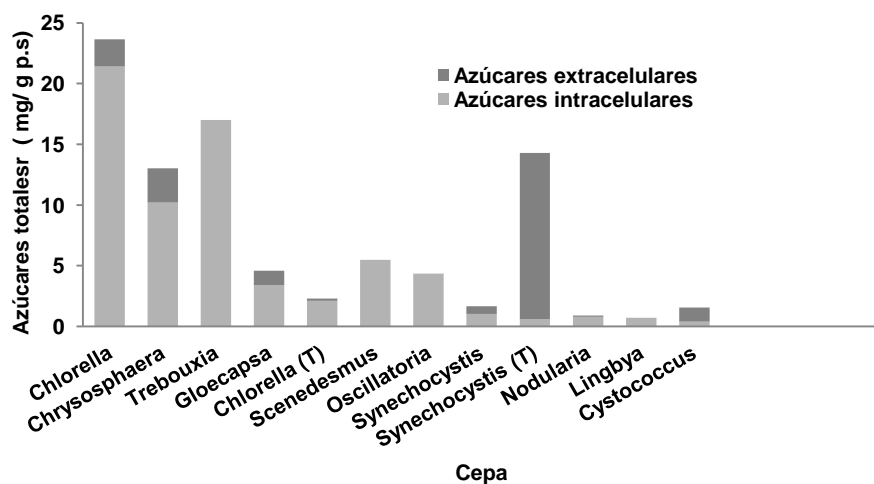


Figura 7. Producción de azúcares totales de cada una de las cepas aisladas.

El contenido de carbohidratos que presentan las microalgas es muy variable; depende de la especie, así como las condiciones de cultivo; sin embargo, valores medios se pueden establecer para la composición química de las microalgas: proteína 30%, carbohidratos 25%, lípidos 21 % y el resto otros compuestos no clasificados (Ben-Amotz, 1987). Estudios de otros autores reportan azúcares totales para el caso de *Chlorella* en porcentajes que van desde el 5 al 20% (Maksimova, 2004), los cuales son cercanos a los obtenidos en este trabajo, aunque las condiciones de cultivo son diferentes. En el caso de *Scenedesmus* se han reportado porcentajes de azúcares aún mayores que para *Chlorella*, alcanzando valores entre 12-50% dependiendo de la especie (Gouveia, 2011), nuevamente se tendrán que

definir las condiciones de cultivo para este género, y la especie de la que se trata, para poder comparar la producción de carbohidratos totales.

Con base en la producción de azúcares totales por cada una de las microalgas aisladas se estableció la eficiencia de producción de azúcares, considerada como los azúcares totales por gramo de biomasa (p.s.) por litro de cultivo. Las cepas más eficientes bajo este criterio fueron: *Chlorella.*, *Chryso-sphaera*, *Trebouxia* y *Scenedesmus* (Tabla 8).

Las cuatro cepas con mayor eficiencia de producción de azúcares fueron seleccionadas para evaluar el efecto del estrés osmótico en el crecimiento y el efecto del choque osmótico en la producción o acumulación de azúcares (Fig. 8).

Tabla 8. Producción de azúcares intracelulares, extracelulares y totales y factor de eficiencia de las cepas asiladas.

Cepa	Azúcares intracelulares	Azúcares extracelulares	Azúcares totales	Biomasa p.s.	Eficiencia *
<i>Chlorella</i>	21.4	2.24	23.64	1.36	29.11
<i>Trebouxia</i>	17	0	17	0.6	6.22
<i>Chryso-sphaera</i>	10.2	2.83	13.03	0.32	5.44
<i>Scenedesmus</i>	5.48	0	5.48	1.58	5.37
<i>Chlorella (T)</i>	2.1	0.2	2.3	0.64	2.7
<i>Oscillatoria</i>	4.36	0	4.36	1.24	2.61
<i>Synechocystis</i>	1.04	0.63	1.67	1.74	1.81
<i>Nodularia</i>	0.8	0.1	0.9	2.16	1.3
<i>Lyngbya</i>	0.7	0	0.7	2.56	1.02
<i>Synechocystis (T)</i>	0.6	13.7	14.3	1.18	0.83
<i>Cystococcus</i>	0.39	1.17	1.56	1.76	0.7
<i>Gloecapsa</i>	3.4	1.2	4.6	0.9	0.27

\*mg of azúcares totales/ L medio de cultivo

### 3.1 Caracterización de las cepas seleccionadas.

La clasificación taxonómica de las cuatro cepas seleccionadas es (NCBI 2011)( Sub-reino, Reino, Filo, Clase, Orden, Familia, Género):

- ***Chlorella* sp**

*Eukaryote*

*Viridiplantae*

*Chlorophyta*

*Trebouxiophyceae*

*Chlorellales*

*Chlorellaceae*

***Chlorella***

- ***Scenedesmus* sp**

*Eukaryote*

*Viridiplantae*

*Chlorophyta*

*Chlorophyceae*

*Sphaeropleales*

*Scenedesmaceae*

***Scenedesmus***

- ***Trebouxia* sp**

*Eukaryote*

*Viridiplantae*

*Chlorophyta*

*Trebouxiophyceae*

*Microthamniales*

***Trebouxia***

- ***Chrysothaera* sp**

*Eukaryote*

*Stramenopiles*

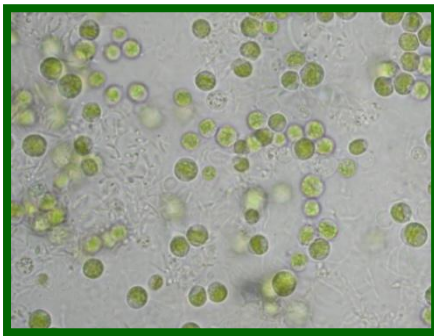
*Chrysophyceae*

*Chrysothales*

*Chrysothaeraceae*

***Chrysothaera***

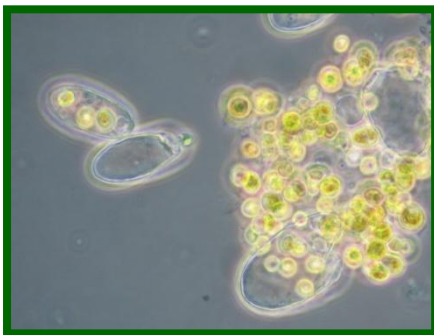
En cuanto a morfología, *Chlorella* sp. presentó forma de esferas regulares de 3.9  $\mu\text{m}$ , sin pirenoide y con poco almidón como materia de reserva. En el caso de *Scenedesmus* sp. la mayoría de las células se encontró en paquetes de cuatro de 8.4  $\mu\text{m}$  de largo y 5  $\mu\text{m}$  de ancho, con espinas cortas. *Trebouxia* sp. presentó varios estados reproductivos, esporangios, zoides y células libres, éstas últimas eran más abundantes. Las células libres de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro presentaban pirenoide y era globosa y redonda. *Chryso-sphaera* sp. son células pequeñas irregulares entre 5-7  $\mu\text{m}$  con dos flagelos uno corto y otro más largo aparentemente no móviles (Fig.8).



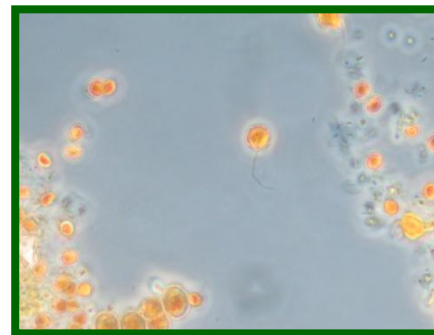
***Chlorella* sp.**



***Scenedesmus* sp.**



***Trebouxia* sp.**



***Chryso-sphaera* sp.**

Figura 8. Fotografías en microscopio óptico de *Chlorella* sp. 100x, *Scenedesmus* sp. 100x, *Trebouxia* sp. 100x en lugol y *Chryso-sphaera* sp. 100x en lugol



#### 4. Efecto de la concentración de NaCl en el crecimiento de *Chlorella* sp., *Trebouxia* sp., *Scenedesmus* sp. y *Chryso-sphaera* sp.

La presencia de cloruro de sodio en el medio de cultivo afectó el crecimiento de las cepas. Para el caso de la *Chlorella* sp. el crecimiento se inhibió a concentraciones de 0.4 y 0.6 M, a 0.2 M, el crecimiento disminuyó un 78 % (Fig.9), estos resultados indican que es una microalga con baja halotolerancia o estenohalina. Existen trabajos con *Chlorella vulgaris* donde el crecimiento disminuyó 50% a 0.6 M, 30% a 0.4, y 10% a 0.2 M de NaCl (Gustavs, 2010), mostrando mayor tolerancia al cloruro de sodio que la *Chlorella* sp. Esta diferencia puede deberse a que la especie aislada en este trabajo proviene de agua dulce, mientras que *Chlorella vulgaris* fue aislada de medios salinos o salobres.

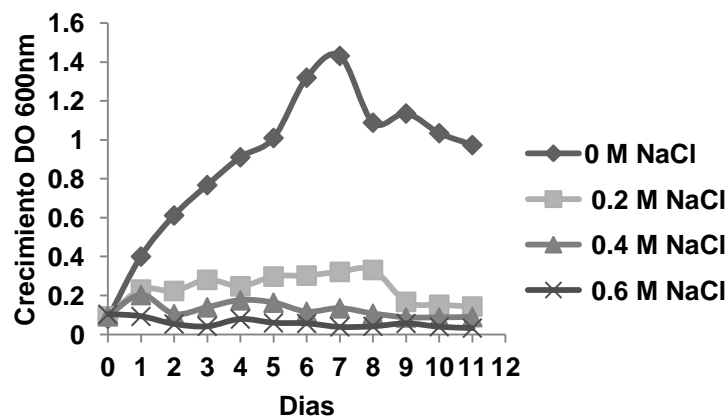


Figura 9. Efecto de la concentración de NaCl en el crecimiento de *Chlorella* sp..

*Trebouxia* sp. en medio BG11 con NaCl .04 M, al cuarto día mostró un incremento en el crecimiento del 43 % respecto a la cepa sin NaCl (Fig. 10), mientras que a 0.2 y 0.6 M, el crecimiento disminuyó 50% con respecto al cultivo que no contenía NaCl. Es probable a que dicha molaridad (0.4M) se presente un proceso de adaptación a medios salinos. Brock (1975) en trabajos con este mismo género, aunque no se precisa la especie, mencionó que puede presentarse un proceso de adaptación a concentraciones hasta de 2.8 M, el cual puede iniciarse después de 16 días de haber iniciado el cultivo, pero la adaptatación se presenta entre 2 y 3 M, por arriba de esa molaridad el proceso de adaptación se inhibe.

*Trebouxia*, es un género de microalga que generalmente es un fotobionte de líquenes, participando en el proceso de liquenización en donde es necesario que ambos organismos sean capaces de adaptarse a cambios de humedad y por ende de salinidad. En el proceso de liquenización se inducen cambios en los microbiontes de los líquenes; siendo el más importante el que sufre en la pared celular; esto con el fin de facilitar la resistencia a los continuos ciclos de desecado y humectación al que están sometidos, lo cual representaría para el fotobionte un cambio en la concentración de sales del medio ( Barrena, 2003). El hecho de que en la especie que trabajó en esta tesis, sólo presentó esta adaptación con 0.4 M y no 0.6 ni 0.2 M, podría ser una característica propia de la especie aislada, este tipo de fenómeno concuerda con los informes de Brock (Brock, 1975).

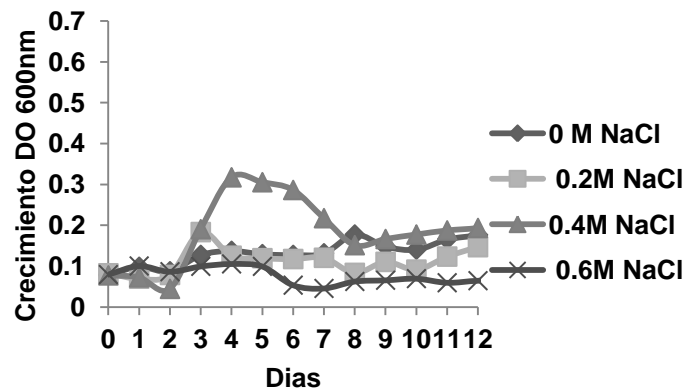


Figura 10. Efecto de la concentración de NaCl en el crecimiento de *Trebouxia* sp..

Con *Chrysozphaera* sp., el efecto del NaCl fue totalmente inhibitor del crecimiento. El Laboratorio Nacional de Energías Renovables de Estados Unidos ha realizado pruebas con diferentes especies de algas, incluyendo *Chrysozphaera*, estudiando la producción de metabolitos de interés comercial tales como proteínas, lípidos y carbohidratos así como el crecimiento en diferentes medios de cultivo. Mostrando que *Chrysozphaera* es altamente susceptible a cambios de salinidad, temperatura y medios de cultivo (National Renewable Energy Laboratory, 1998). Lele (2007) reporta que este género puede ser productor de lípidos; sin embargo, es muy susceptible a cambios en la formulación de medios de cultivo.

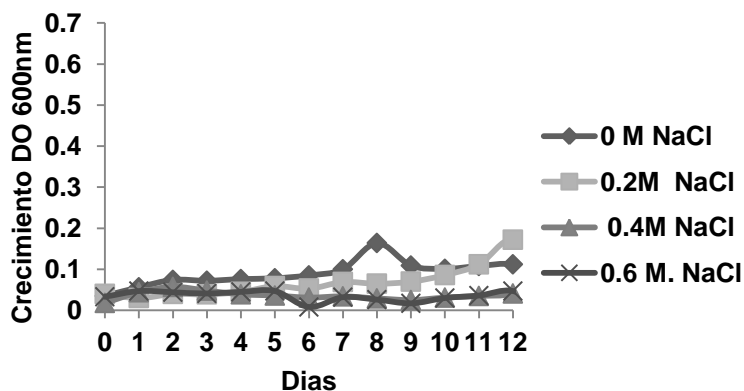


Figura 11. Efecto de la concentración de NaCl en el crecimiento de *Chrysoisphaera* sp.

En *Scenedesmus* sp. cualquiera de las concentraciones de NaCl probadas inhibieron el crecimiento (Fig. 12). En *Scenedesmus incrassatulus* Bohl, el crecimiento fue disminuido a partir de una concentración de NaCl 0.175 M (Fedina, 2000), mostrando además una reducción en la fijación de bióxido de carbono y un aumento en la producción de prolina. Por otra parte Shanab (2007), reportó la inhibición del crecimiento, así como en la producción de pigmentos en *Scenedesmus* cuando la concentración de NaCl en el medio fue mayor a 0.2 M de NaCl ; sin embargo, la producción de azúcares y proteínas aumentó cuando la concentración de la sal se incrementó hasta 0.4 M (Shanab, 2007).

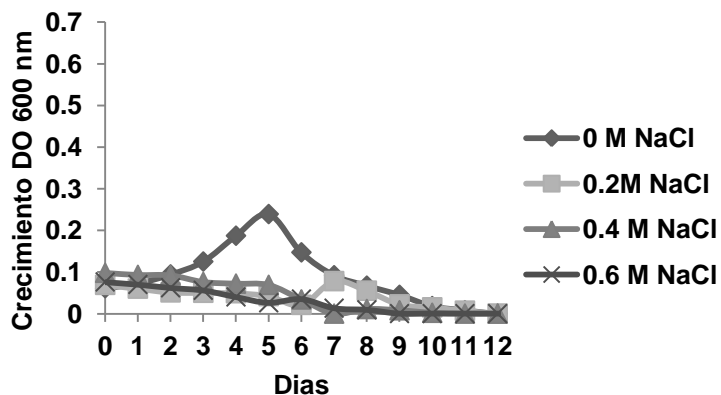


Figura 12. Efecto de la concentración de NaCl en el crecimiento de *Scenedesmus* sp.

Para las cuatro cepas estudiadas la presencia de cloruro de sodio en el medio tiene un efecto negativo sobre el crecimiento; siendo el efecto menor sobre *Chlorella* sp. y el mayor para *Chrysoisphaera* sp. donde la presencia de NaCl es inhibitoria desde concentraciones

mínimas, Esto podría indicar que *Chlorella* sp., es un buen candidato para la obtención de azúcares por choque osmótico, ya que es más halotolerante que el resto de las cepas aislada.

### 5.- Efecto del choque osmótico en la producción de azúcares.

Al someter las cuatro cepas seleccionadas a choque osmótico, en las seis concentraciones de NaCl empleadas, todas mostraron un aumento en la producción de azúcares tanto intra como extracelulares

La cepa de *Chlorella* sp. incrementó la producción total de azúcares hasta de 18 veces después de 24 h del choque osmótico a la concentración de 0.4 M de NaCl (de 29 a 421 mg/g ps) (Fig. 13).

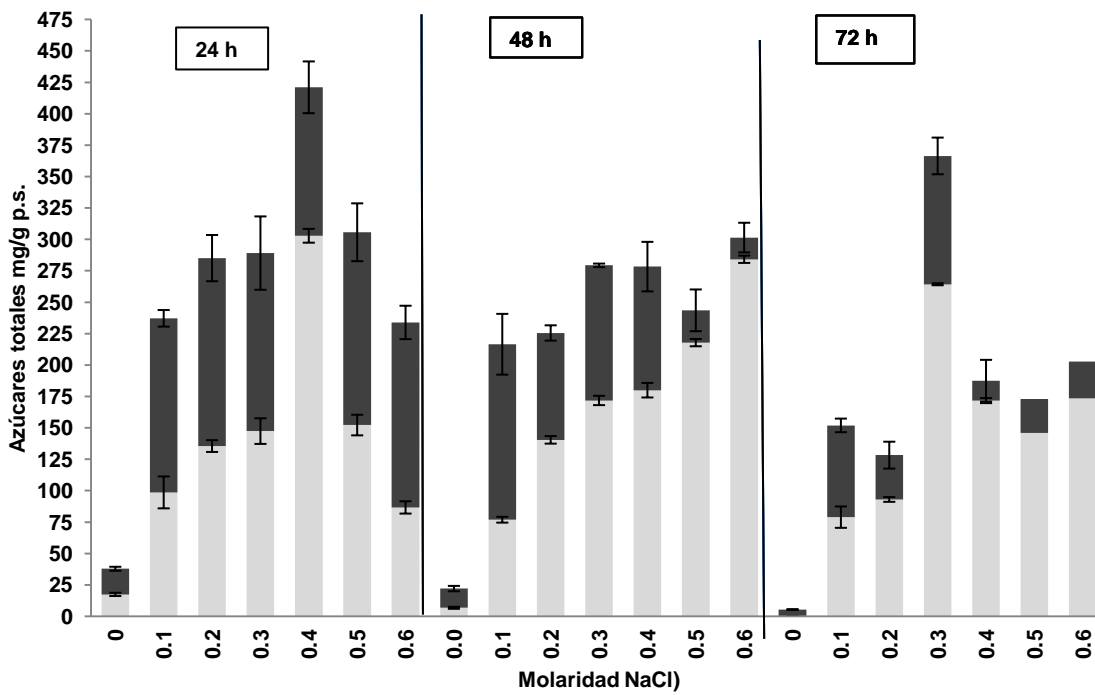


Figura 13. Efecto del choque osmótico en la producción total de azúcares en *Chlorella* sp. en medio BG11. Azúcares intracelulares , ■ azúcares extracelulares ■

En el caso de *Trebouxia* sp., igualmente se presentó un aumento de la concentración de azúcares totales, siendo aún más elevado en los azúcares extracelulares. La máxima producción se alcanzó a las 72 h después del choque osmótico con 0.6 M, concentración a la cual la producción aumentó 60.6 veces, de 4.36 a 274.11 mg/g p.s. (Fig. 14). La producción de azúcares aumentó directamente en forma proporcional al tiempo del choque osmótico, la producción de azúcares a las 72 h es el doble de la que se produjo a las 24 h. En cuanto a la molaridad del NaCl, parece ser que no hay una tendencia establecida al menos en las pruebas que se realizaron.

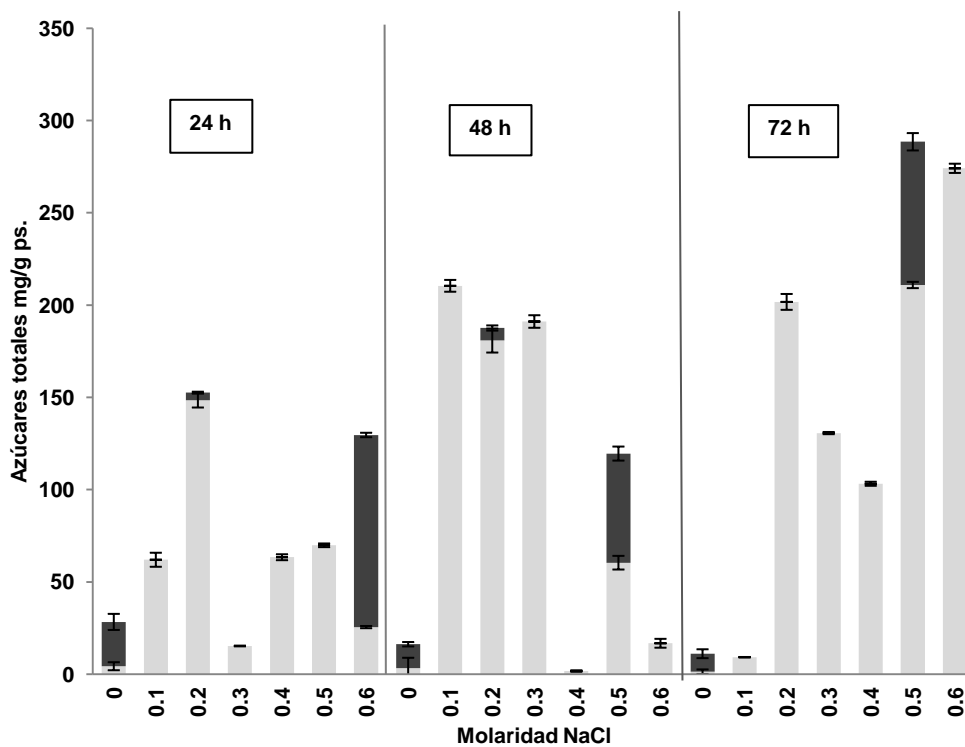


Figura 14. Efecto del choque osmótico en la producción total de azúcares en *Trebouxia* sp. en medio BG11. Azúcares intracelulares , ■ azúcares extracelulares

*Chrysothrix* sp.. presentó un aumento de la producción de azúcares extracelulares en los tres tiempos del choque y una disminución en la producción de azúcares intracelulares, de hecho en la mayoría de los casos no se encontraron azúcares intracelulares (Fig. 15). La

mayor producción de azúcares extracelulares se presentó a las 48 h del choque a una concentración salina de 0.4M, alcanzando hasta 253 mg/g p.s, siendo ésta, 253 veces mayor que sin choque osmótico. Para esta cepa se observó que la mejor producción de azúcares en los tres tiempos empleados se alcanzó en la concentración de 0.4M de NaCl.

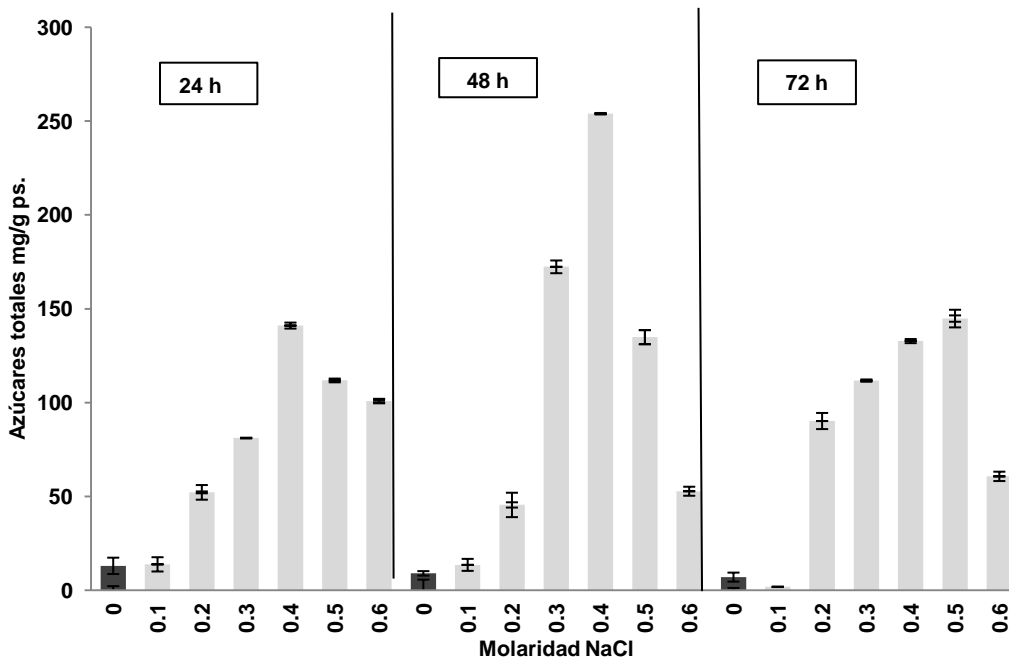


Figura 15. Efecto del choque osmótico en la producción total de azúcares en *Chrysothrix* sp en medio BG11. Azúcares intracelulares , ■ azúcares extracelulares ■

En el caso de *Scenedesmus* sp., hubo un gran aumento en la producción de azúcares extracelulares a las 24 h al someterla a un choque osmótico con NaCl 0.1 M, siendo este aumento de 29 veces, de 22 a 650 mg/g p.s. (Fig. 16). Sin las embargo, a las 48 h los azúcares disminuyeron a la mitad, 10 veces los azúcares que se produjeron sin choque osmótico y a las 72 h no hubo aumento. A las 72 h se presentó lisis celular. En las pruebas del efecto de la salinidad en el crecimiento, esta cepa mostró inhibición con la presencia del cloruro de sodio, después de 72 h (Fig. 11).

En las cuatro cepas se observó un aumento en la producción de azúcares totales y en especial en los azúcares extracelulares. Page *et al.* (1999) sometieron una cepa de *Sytonema* durante 24 h, a una concentración de 0.15 M y los azúcares totales aumentaron 15 veces; y en trabajos con *Synechocystis* PCC 6714 después de someterla a choque osmótico con NaCl 0.3 M, los azúcares totales aumentaron 13 veces (Warr, 1985), ambos trabajos presentaron un incremento de azúcares menor al que se alcanzó en este trabajo donde se alcanzaron incrementos de azúcares totales hasta de 29 veces, la cual mostró la cepa de *Scenedesmus* sp., .

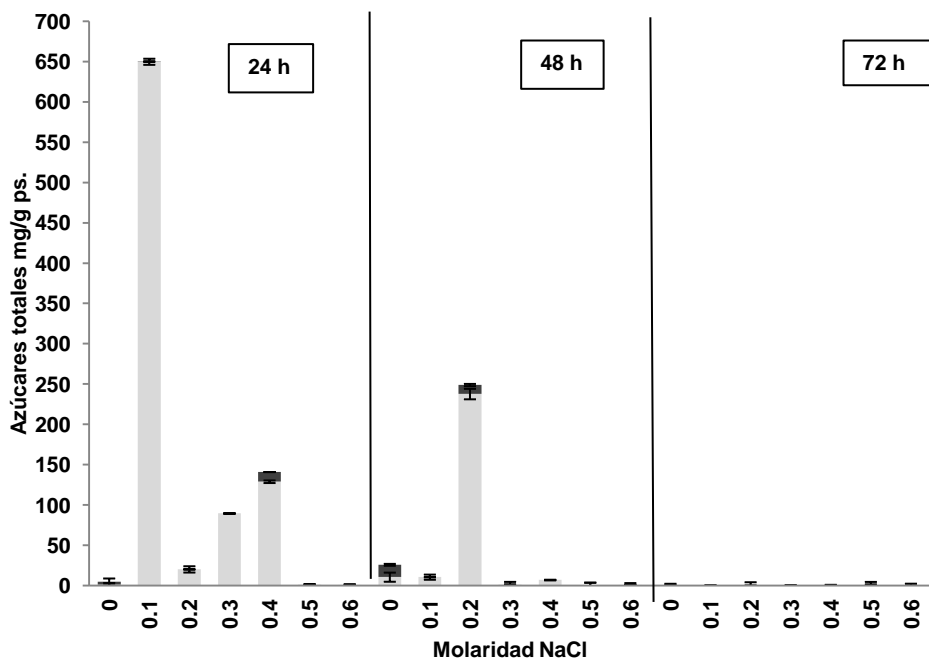


Figura 16. Efecto del choque osmótico en la producción total de azúcares en *Scenedesmus* sp. en medio BG11. Azúcares intracelulares , ■

Azúcares extracelulares ■

Comparando la producción de azúcares después del choque osmótico, de las cuatro cepas seleccionadas, se observó que la mayor producción de azúcares la presentaron *Scenedesmus* sp., y *Chlorella* sp., con 649.93 y 421.02 mg/g ps respectivamente (Tabla 9); por lo que se procedió a determinar la composición de los azúcares que se producen como osmorreguladores en ambas cepas, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Tabla 9.Efecto del choque osmótico en la producción de azúcares.

Cepa	Máxima producción de azúcares totales (mg/g ps)	Tiempo (h) <sup>1</sup>	NaCl (M) <sup>2</sup>
<i>Scenedesmus</i> sp	649.93	24	0.1
<i>Chlorella</i> sp	421.02	24	0.4
<i>Trebouxia</i> sp	288.49	72	0.5
<i>Chryso-sphaera</i> sp	253.95	48	0.4

El análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de las fracciones extracelulares, después del choque osmótico para *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., mostraron que los azúcares de mayor abundancia fueron sacarosa y trehalosa. La cepa de *Chlorella* sp. a las 24 h del choque osmótico con 0.4 M NaCl presentó un incremento en la concentración de sacarosa y trehalosa de 1.13 a 1.95 mg/g ps, incremento del 42%. y de 0.012 a 0.019 mg/g ps (incremento del 37%) respectivamente. En la fracción intracelular no se encontraron ni trehalosa ni sacarosa (Fig.17)

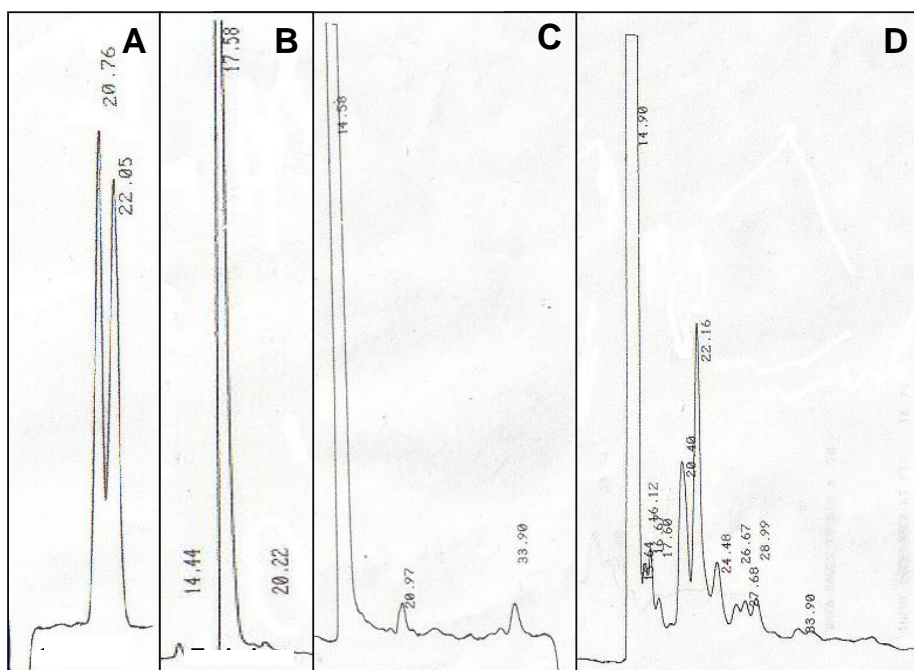


Figura 17. Cromatogramas por HPLC de sacarosa (A) y trehalosa (B), Extracto de *Chlorella* sp., sin choque osmótico(C) y con choque osmótico de 0.4 M después de 24 h (D)

En el caso de *Scenedesmus* sp., la concentración de sacarosa y trehalosa incrementó en la fracción extracelular. La sacarosa aumentó 76% (0.112 a 0.464 mg/g ps) y la trehalosa, 37% (0.008 a 0.112 mg/g p.s) de (Fig.18). Para la fracción intracelular la sacarosa aumentó un



92% (0.0256 a 0.32 mg/g ps) y la trehalosa no mostró incremento alguno, permaneció en 0.008 mg/g p.s, (Fig. 19).

Para ambas cepas, *Chlorella* y *Scenedesmus*, hubo un mayor incremento de sacarosa que de trehalosa, después del choque osmótico, lo cual indica que la sacarosa es el principal osmorregulador que producen. Este resultado no había sido reportado con anterioridad por otros autores. En estudios con una cepa de *Scytonema*, bajo choque osmótico, la concentración intracelular de trehalosa y sacarosa aumentó rápidamente en una fase inicial, seguido de un incremento lento que se estabilizó a las 48 h (2.4% trehalosa y 1.2% sacarosa). Una de las razones por las cuales el aumento en la trehalosa fue mayor, es porque la trehalosa podría ayudar a la estabilización de las proteínas de la membrana celular, y por lo tanto sería de suponer que fuese el osmorregulador más abundante (Page-Sharp, 1999). En los resultados del presente trabajo la trehalosa no es el osmorregulador más abundante sino la sacarosa, aunque existe presencia de trehalosa que podría estar contribuyendo a la estabilización de las proteínas de la membrana celular.

En el género *Chlorella* los osmolitos más abundantes son la prolina y la sacarosa (Ben-Amotz 1983; Colaco, 1993; Oren 2007), sin embargo, no se ha encontrado trehalosa en fracciones ni intracelulares ni extracelulares. Más específicamente, las especies terrestre *Chlorella trebouxioides*, y *Chlorella luteoviridis* SAG2196, acumulan polioles tales como ribitol y sorbitol (Ben-Amotz, 1983). En el presente trabajo se reporta por primera vez la síntesis de trehalosa por el género *Chlorella*, como respuesta al choque osmótico, aunque el osmolito principal fue la sacarosa.

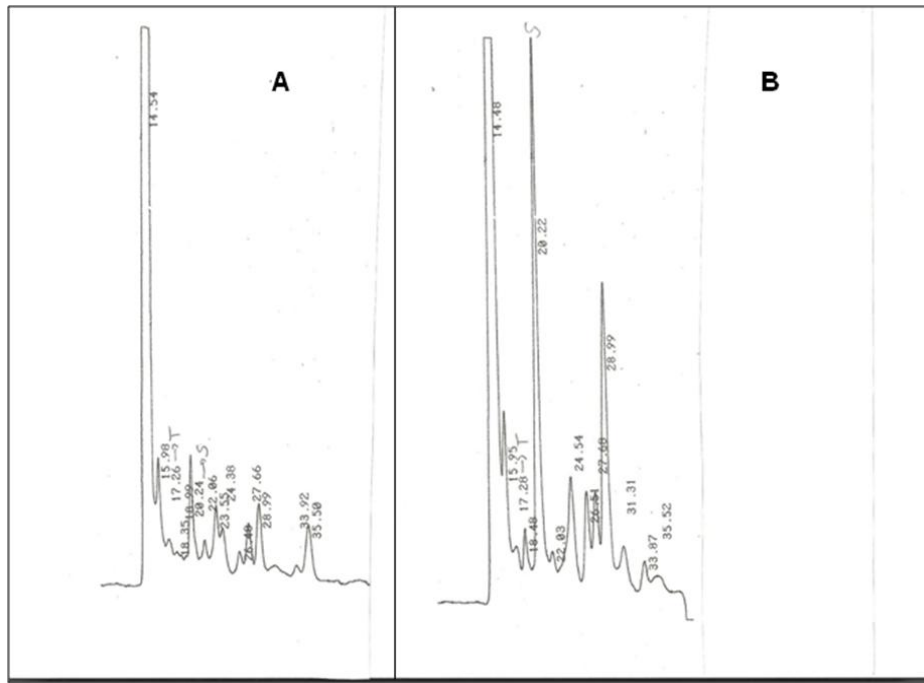


Figura 18. Cromatogramas de HPLC del extracto extracelular de *Scenedesmus* sp., sin choque osmótico(A) y con choque osmótico de 0.1 M después de 24 h (B)

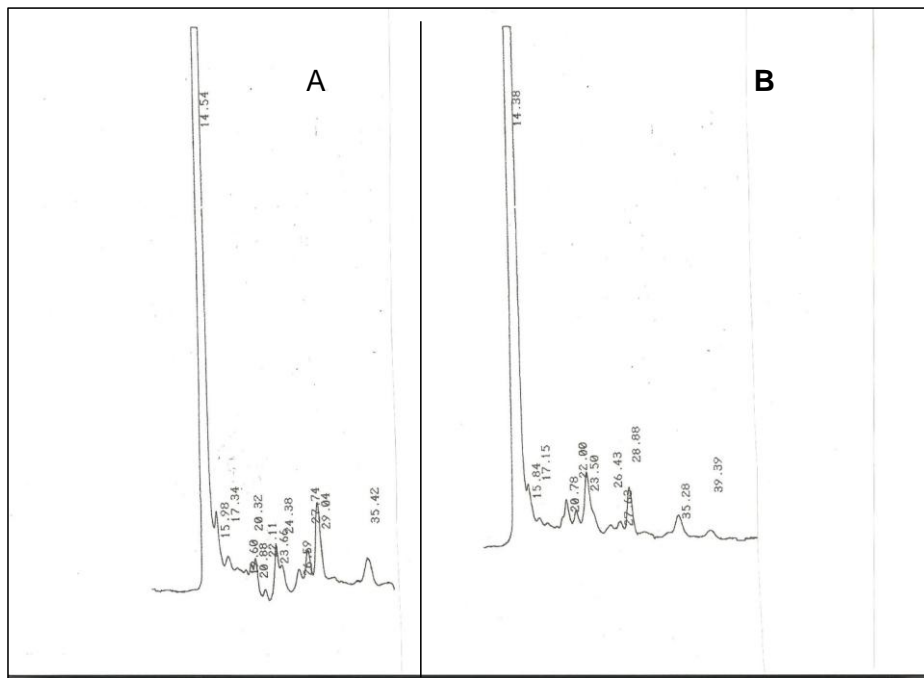


Figura 19. Cromatogramas de HPLC del extracto intracelular de *Scenedesmus* sp., sin choque osmótico(A) y con choque osmótico de 0.1 M después de 24 h (B)

La dos cepas, *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., presentaron un incremento importante en la producción de azúcares fermentables; sacarosa y trehalosa, por lo cual se hizo un análisis de los resultados obtenidos en cuanto a parámetros de velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación, producción óptima de carbohidratos totales bajo choque osmótico así como la composición de los azúcares fermentable obtenidas. La cepa *Chlorella* sp. tiene mayor velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y mayor producción de sacarosa, en el mismo tiempo del choque osmótico que *Scenedesmus* sp (Tabla 10), por lo que la mejor cepa para producir azúcares fermentables de todas las cepas estudiadas es *Chlorella* sp.

Tabla 10. Tabla comparativa de resultados de velocidad específica de crecimiento, rendimiento de azúcares totales y producción de osmolitos como carbohidratos fermentable para las cepas de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., aisladas.

Parámetro	<i>Chlorella</i> sp	<i>Scenedesmus</i> sp
$\mu$ ( BG11, 25°C, 4vvm)	0.628 /h	0.479 /h
Molaridad óptima de sal para producción de carbohidratos	0.4 en 24 h	0.1 en 24 h
Carbohidratos totales intracelulares óptimos bajo choque osmótico	54.47 g/L	0.12 g/L
Carbohidratos totales extracelulares óptimos bajo choque osmótico	107.52 g/L	269.45 g/L
Osmorreguladores producidos (mg/g ps)	Sacarosa (1.95) Trehalosa (0.019)	Sacarosa (0.464) Trehalosa (0.112)

La mayor producción de azúcares como osmolitos que produce *Chlorella* sp. se encontraron en la fracción extracelular, aunque se esperaría que fuera intracelular al ser un agente osmorregulador, el cual se produce para permitir la viabilidad de la célula frente a concentraciones elevadas de NaCl (Oren, 2002). Para poder entender mejor el mecanismo de osmoregulación en cuanto a la producción intracelular y extracelular de osmolitos, con *Chlorella* sp , se procedió a determinar la concentración total de azúcares intra y extracelular durante las primeras 24 h, después del choque con 0.4 M NaCl, en periodos de tiempo de 4 h y así poder determinar si en alguno de estos puntos los azúcares se encuentran dentro de la célula y posteriormente son difundidos al exterior. Durante las primeras 12 h después del

choque los azúcares intracelulares aumentaron hasta llegar a 383 mg/g ps y a las 16 h empezaron a disminuir y a las 24 h se obtuvo únicamente 30.72 mg/g p.s. (Fig. 20). En cambio los azúcares extracelulares las primeras doce horas fueron de 57 mg/g ps, y a las 16 h aumenta hasta 461 mg/ g p.s. donde permanecieron hasta las 24 h.

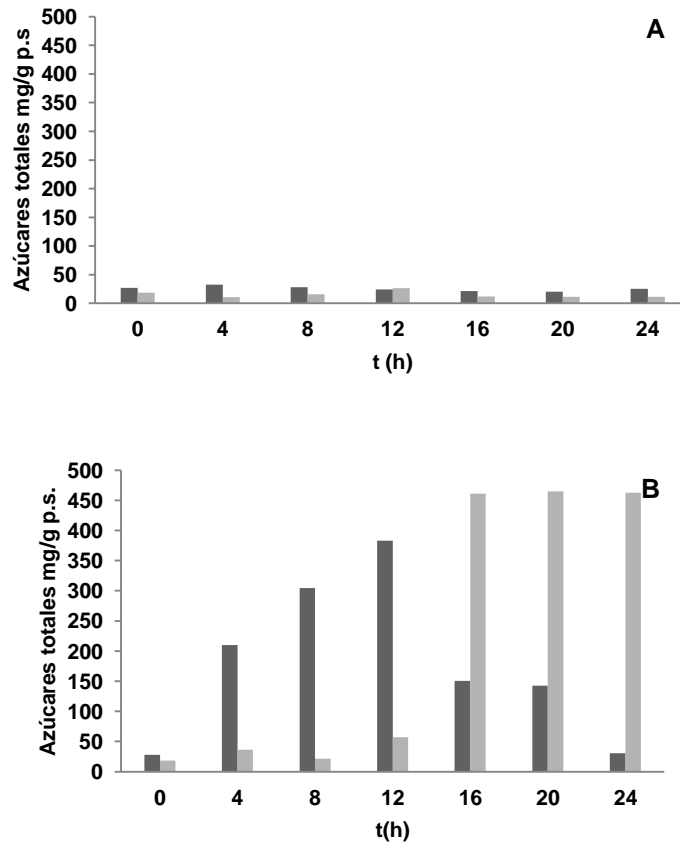




Figura 20. Resultados de la producción total de azúcares intracelular  y extracelulares , de *Chlorella* sp: A. sin choque osmótico. B. Con choque osmótico con 0.4 M NaCl,

Los resultados encontrados en esta prueba indicaron que en las primeras 12 horas después del choque osmótico, se produjeron gradualmente los carbohidratos como osmorreguladores dentro de la célula, pero entre las 12 y 16 h éstos carbohidratos fueron difundidos al medio, alcanzando a las 24h su máxima concentración fuera de la célula. En otro género de algas tales como *Asteromonas gracilis*, la cual produce glicerol como osmolito, se determinó que la concentración del osmolito dentro de la célula dependía de la concentración salina del choque osmótico y de la temperatura. En concentraciones menores a 3.5 M, el glicerol se encontraba dentro de la célula pero al aumentar dicha concentración el glicerol se difundía por la membrana hacia el exterior, lo mismo pasaba a temperaturas mayores de 40°C (Ben-

Amotz, 1981). Con *Chlorella pyrenoidosa*, se encontró que medios de cultivo enriquecidos, la célula produce carbohidratos y polisacáridos que son liberados al medio a través de procesos de difusión a través de la membrana para evitar la acumulación dentro de la célula, y estos procesos de difusión dependen de la actividad fotosintética y de la reproducción celular (Maksimova, 2004). En el caso de la *Chlorella* sp. que se estudió en este trabajo, más que la salinidad, la difusión de los osmolitos al medio puede haberse debido a cambios en la actividad fotosintética de la célula, ya que ésta se ve afectada a 0.4M, en las primeras 24 h, lo cual se pudo apreciar en la determinación de dicha actividad a través de medición in vivo por fluorescencia. Sin embargo, habría que profundizar en dicha determinación para poder establecer en qué nivel se podría ver afecta la fotosíntesis.

La difusión de los osmorreguladores producidos por *Chlorella* sp. frente al choque osmótico de 0.4 M, ocurrió entre las 12 y las 16 h, probablemente debido a cambios en la actividad fotosintética y era importante conocer el tipo de azúcares producidos, por lo que se analizaron por HPLC las fracciones intra y extracelulares. Los resultados obtenidos fueron que las especies presentes en ambas fracciones eran trehalosa, sacarosa y glicerol, las cuales se encontraban en diferentes concentraciones en las diferentes fracciones. La trehalosa aumentó 99% en la fracción extracelular y disminuyó un 83% en la fracción intracelular, entre las 12 h a las 16 h, la sacarosa aumentó 92% en la fracción extracelular y casi permaneció constante en la intracelular; en cuanto al glicerol, aumentó un 97% en la fase extracelular a partir de de las 12 y 16 horas (Tabla 11, Figs. 20 y 21).

Tabla 11. Concentración de azúcares intra y extracelulares a las 12 y 16 h después del choque osmótico de *Chlorella* sp..

Tiempo del choque	Extracto	trehalosa (mg/g p.s)	sacarosa (mg/g p.s)	glicerol (mg/g p.s)
12	Intracelular	0.217	2.98	0.77
12	Extracelular	0.005	1.93	0.16
16	Intracelular	0.028	2.96	1.7
16	Extracelular	2.06	24.55	0.75

El aumento de los tres osmorreguladores en el medio, es decir en la fracción extracelular, es congruente con los resultados de carbohidratos totales determinados por la técnica de Dubois (1956).

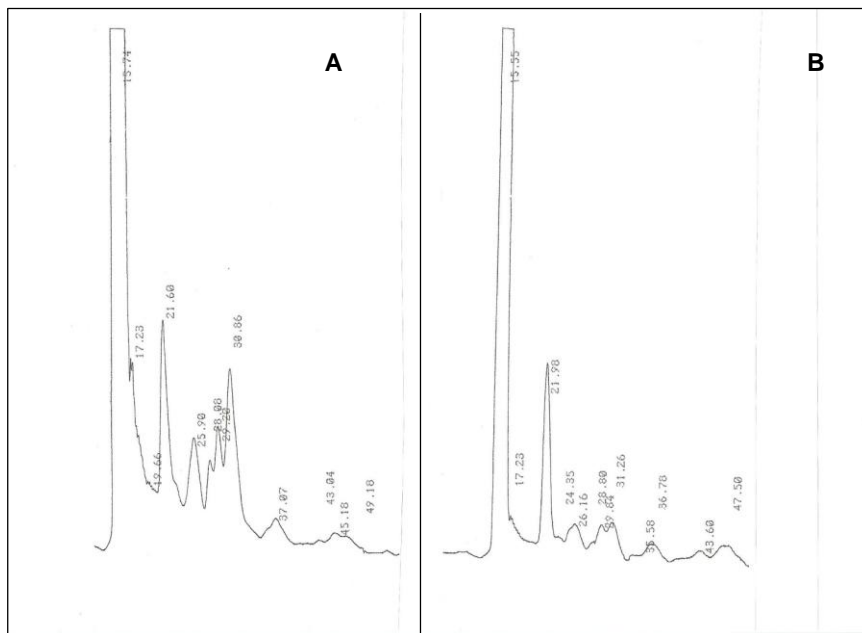


Figura 21 Cromatogramas de HPLC de los extractos A biomasa, B sobrenadante, obtenidos después de 12 h de choque osmótico con 0.4 M NaCl.

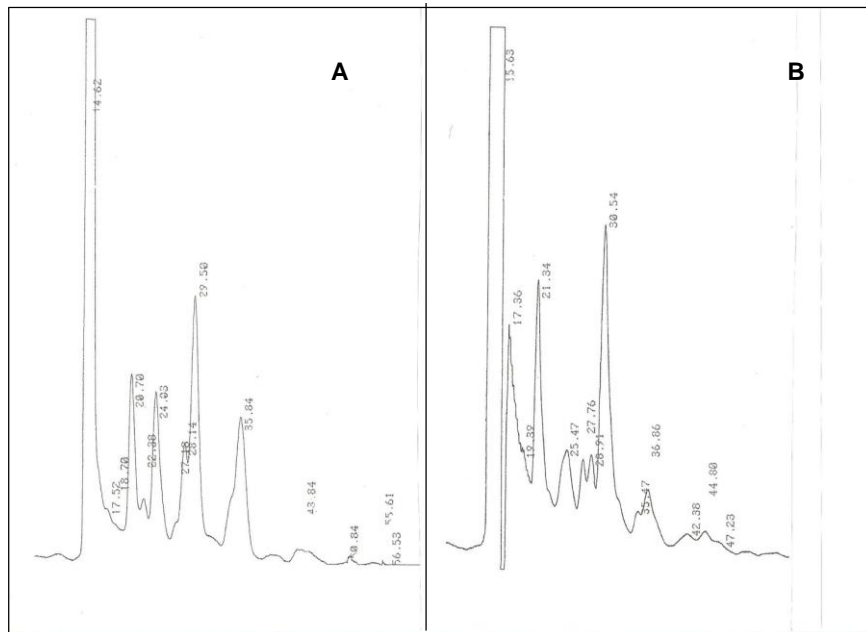


Figura 22 Cromatogramas de HPLC de los extractos A biomasa, B sobrenadante, obtenidos después de 16 h de choque osmótico con 0.4 M NaCl.

Al hacer el examen detallado de los cromatogramas se observó la presencia de un pico alrededor de 44 min de tiempo de retención, por lo que se procedió a determinar la composición de dicho compuesto. De acuerdo al método empleado y las características de la columna empleada, el pico podría ser un alcohol, incluso un polialcohol. A través de estándares se determinó que el pico, correspondía a etanol (Fig. 22). Se conoce que las microalgas en ciertas condiciones de limitación de oxígeno, durante la fase oscura de la fotosíntesis, puede realizar metabolismo de fermentación, la cual puede producir etanol e hidrógeno, los cuales se liberan al medio. Hirano (1997) logró aislar una especie de *Chlamydomonas reinhardtii*, la cual era capaz de producir 1% de etanol (w/w). En estudios posteriores se determinó que en dichas condiciones, anóxicas, esa misma cepa era capaz de variar la actividad de la hidrogenasa, para poder inducir la fermentación como fuente de energía, limitando la acumulación de productos potencialmente tóxicos (Mus, 2007; Dubini, 2009). Dichos estudios han sido enfocados a la producción de hidrógeno como energético proveniente de microalgas, sin embargo en el presente estudio el interés del producto de fermentación se dirigió hacia el etanol.

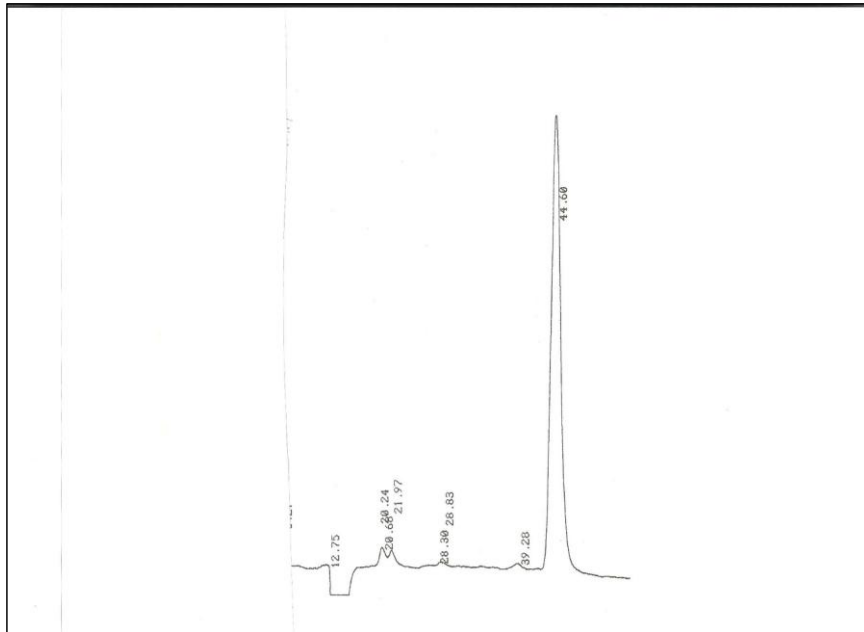


Figura 23 Cromatograma de HPLC de un estándar de etanol.



## VII CONCLUSIONES

- ✓ Se aislaron 12 cepas de microalgas a partir de ecosistemas diferentes, las cuales producen azúcares intra y extracelulares en medio BG11. La cepa de *Chlorella* sp.. Alcanzó la máxima producción de azúcares (29.1 mg azúcar/g de biomasa p.s).
- ✓ El estrés salino a 0.4 M tuvo un efecto de inhibición del crecimiento, para las cuatro cepas productoras de azúcares: *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Trebouxia* sp. y *Chryso-sphaera* sp..
- ✓ Al someter las cepas *Chlorella* sp.. a un choque osmótico con NaCl 0.4 M a las 24 h la producción de azúcares totales aumentó 14 veces. *Scenedesmus* sp.. frente a un choque osmótico con NaCl 0.1 M, aumentó 29 veces la producción de azúcares totales a las 24h.
- ✓ En el caso de *Chlorella* sp. los osmorreguladores producidos, en orden de abundancia son: sacarosa, glicerol y trehalosa;
- ✓ La producción de trehalosa como osmorregulador en *Chlorella* sp., es la primera vez que se reporta.
- ✓ La producción de osmolitos por *Chlorella* sp., se lleva a cabo en las primeras 12 h después del choque osmótico, encontrándose dentro de la célula. Después de ese tiempo los osmorreguladores son excretados al medio por cambios en el metabolismo de la misma. Ya que los azúcares fermentables son excretados al medio después de las 12 h, se facilita la separación de los mismos.
- ✓ Se determinó la presencia de etanol después del choque osmótico como producto extracelular de la cepa de la *Chlorella* sp., lo cual puede conllevar a pensar que esta microalga realiza fermentación alcohólica, lo cual sería potencialmente aplicable para la producción de bioetanol, además de la producción de azúcares fermentables.

## VIII PERSPECTIVAS.

De acuerdo a los resultados obtenidos habrían dos caminos para seguir el trabajo de investigación: el primero sería estudiar procesos de separación de los azúcares del resto del medio de cultivo, para luego fermentarlos y producir el etanol, y el segundo camino sería profundizar en el metabolismo fotosintético y fermentativo de las células de *Chlorella* sp., para determinar si es posible aumentar la producción directa de etanol a través de manipulación de las condiciones del cultivo tales como aireación, periodos de obscuridad, formulación de medio de cultivo, etc.

Otra posibilidad sería emplear los azúcares producidos para producir bioetanol, así como los lípidos y proteínas pueden ser empleados para producir biodiesel y otro tipo de productos comerciales. Existen evidencias con otro tipo de microalgas tales como el *Botryococcus braunii* (Vazquez-Duhalt, (1991), que al aumentar la concentración de NaCl en el medio de cultivo, disminuye el contenido de proteína. Este tipo de variaciones en la concentración salina así como de otros componentes del medio de cultivo, cantidad de luz, aireación, periodos de obscuridad, etc., el proceso podría dirigirse a aumentar la producción de azúcares, e incluso etanol.

## IX BIBLIOGRAFÍA.

- Abbi, M.; Kuhad, R.C.; Singht A., (1996). "Fermentation of xylose and rice straw hydrosylate to ethanol by *Candida shehatae* NCL-3501". *J. Ind. Microbiol.* , **17**(1): 20-23.
- Ahring, B.K.; Licht, D.; Schmith, A.S.; Sommer, P.; Thomsen, A.B. (1996). "Production of ethanol from wet oxidised wheat straw by *Thermoanaerobacter mathranii*". *Bioresou. Technol.*, **68**: 3-9.
- Aiello, C.; Ferrer, A.; Ledesma, A. (1996). "Effect of alkaline treatments at various temperatures of cellulase and biomass production using submerge sugarcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM 9414". *Bioresou. Technol.*, **57**: 13-18.
- Ahmad I.,Hellebust J.(1984)" Osmoregulation in Extremely Euryhaline Micro-alga *Chlorella autotrophica*". *Plant Physiol.* **74**: 1010-1015.
- Alvarez J.; Escobar S.; López K.; Urrego D. (2010). "Evaluación del crecimiento y polimorfismo en *Scenedesmus* sp.. empleando led's amarillo, azul, rojo y blanco como fuente de luz". Tesis de Licenciatura, Universidad de Medellín Colombia.
- Aoyama, M.; Seki, K. (1999). "Acid catalysed steaming for solubilization of baboo grass xylan". *Biosour. Technol.*, **69**: 91-94.
- Atlas, R., (1984). "Microbiology: Fundamentals and applications". Mac Millan Pub.-New York USA, pp.137-142.
- Avonce, N.; Mendoza, A.; Morret, E.; Iturriaga, G. (2006). "Insights on the evolution of trehalose biosynthesis". *BMC Evolutionary Biol.*, **6**: 109-123.
- Azhar, A.F.; Bery, M.K.; Colcord, A.R., and Roberts, R.S. (1981). "Factors affecting alcohol fermentation of wood acid hydrolysate". *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **11**: 293-300
- Bailey, B. (1993). "Current and potential future performance of ethanol fuels". SAE Paper # 930376, Society of Automotive Engineers, Warrendale., PA.
- Barsarti, L., Gualtieri, P.,M. (2006). "Algae, anatomy, biochemistry and biotechnology." Taylor & Francis Group, Florida U.S.
- Barrena E.; Pérez-Ortega S. (2003). "Líquenes de reserva natural integral de Muniellos, Asturias". Series Naturaleza, Cuadernos de Medio Ambiente. Ed. Consejería de Medio Ambiente. España. Pp. 67-70.

- Batterton, J.; Van Baalen, C., (1971). "Growth responses of blue-green algae to sodium chloride concentration". *Arch. Microbiol* **76**: 151-155.
- Ben-Amotz A.; Grungal T., (1981), "Osmoregulation in the Halotolerant Alga *Asteromonas gracilis*". *Plant Physiol.* **67**(4): 613–616.
- Ben-Amotz, A, y Avron, M. (1983). "Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential". *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 95-119.
- Ben-Amotz, A. (1987). "Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* (Volvocales, Chlorophyta)". *J. Plant Physiol.* **131**: 479-487.
- Biofuels: The Promise and the Risks in World development report (2008). The World Bank [econ.worldbank.org](http://econ.worldbank.org) . p.70.
- Blumwald E.; Mehlhorn J., Packer L. (1983). "Studies of osmoregulation in salt adaptation of cyanobacteria with ESR spin-probe techniques" *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 2599-2602.
- Bourelly P. (1966) "Les Algues d'eau douce," Vol I. Ed. N. Boubeé & Cie., París France.
- Boyle, G. (2004). "Renewable Energy". Second Edition.- UK . Oxford University Press. pp. 10-15.
- Brent K.,B. (1996). "Performance of ethanol as transportation fuel". Handbook on Bioethanol. Eds. Charles E. Wyman : pp. 37-60.
- Brock T. (1975). "Salinity and the Ecology of *Dunaliella* from Great Salt Lake" *J.Gen Microbiol*, **89**:285-292
- Brown, A.D. (1990) "Microbial water stress physiology. Principles and perspectives". Wiley, New York.
- Budny,D.; Sotero, P. (2007). Brazil Institute special report: The Global dynamics of biofuels. Brazil Institute of Woodrow Wilson Center . [www.wilsoncenter.org/index.cfm?fuseaction=topics.publications&group\\_id=](http://www.wilsoncenter.org/index.cfm?fuseaction=topics.publications&group_id=) Consultado 30-09-2007.
- Cabib, E.; Leinor L. (1958) " he biosynthesis of trehalosa phosphate". *J. Biol Chem* **231**: 259-275.
- Campbell. Reece, (2002). "Biology" .6 ed. Pearson Educación Inc.N.J. USA

- Castenholz, R.W. (1969). "Thermophilic blue-green algae and thermal environment". *Bacteriol. Rev.* **33**: 476-504.
- Chandrasek, I and Gaber, B.P. (1988). "Stabilization of a biomembrane by small molecules: interaction of trehalose with the phospholipid bilayer". *J. Biomol. Struct. Dynam.* **51**: 1163-1171.
- Chapman, L.E. y Wilcox, L.W. (2000). "Algae". Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J. Section B-1.
- Chow, J. (2003). Energy resources and global development. *Science.* **302**: 1528-1531.
- Chunxiang, Hu.; Yonding, Liu; Berit, S.P.; Peterson D.; Klaveness, D. (2003). "Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grains". *Carbohydrates Polymers.* **54**: 33-42.
- Ciferri, O., (1983). "Spirulina, the edible microorganism". *Microbiol. Rev.* **47** (4): 551-78.
- Cohen, Y., Padan., E., Shilo, M. (1975). "Facultative anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria". *J. Bacteriol.* **123**: 855-861.
- Cohen, Y., Jorgensen, N.P.; Revsbech, P.; Poplawsky, R. (1986), "Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria". *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 398-407.
- Chisti, Y., (2007). "Biodiesel from microalgae". *Biotechnol. Adv.* **25**: 294-306.
- de la Vega J.A., (2008). Agroproyectos sustentables y Bioenergía" en <http://j.delavagal.googlepages.com.test>.
- Deng, X.; Fei X.; Li Y. (2011), "The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*" *Afric. J. Microbiol. Res.* **5**(3):. 260-270.
- Dubini, A.; Mus, F.; Seibert, M.; Grossman, R. y Posewitz, M. (2009). "Flexibility in Anaerobic Metabolism as Revealed in a Mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* Lacking Hydrogenase Activity," *J. Biol. Chem.*, **284**: 7201-7213.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., (1956). Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.* **28**: 350-356.
- Edmann, N. (1983). "Organic osmoregulatory solutes in blue-green algae" *Pflanzenphysiol.* **10**: 147-155.

Elbein A.D.; Pan, Y.T, Pastuszak I.; Carroll, D. (2003), "New insights on trehalose: a multifunctional molecule". *Glycobiol.* **13**: 17R-27R.

European Renewable Energy Council. Renewable Energy Road Map; Renewable energies in the 21<sup>st</sup> century: building a more sustainable future (2008).

EWEA Executive summary "Analysis of wind energy in the E.U. European Wind Energy Association. [http:// ewea.org](http://ewea.org). consultado 05 febrero 2009.

Fargione, J. (2008). "Land-use change". *Science*, **319** (5867): 1238-1240.

Fedina I.S.; Berderliev K. M. (2000). "Response of *Scenedesmus incrassatulus* to Salt Stress as Affected by Methyl Jasmonate" *Biologia Plantarum*. 43(4): 625-627.

Fischer, C.R.; Klein-Marcuscharmer D.; Stephanopoulos G. (2008). "Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production". *Metabolic Engin..* **10**:295-304

Fotman J.L.; Chhabra S.; Mukhopadhyay A.; Chou H; Lee T.S., Steen E.; Keasling J. (2008). "Biofuels alternatives to ethanol: pumping the microbial well". *Trends in Biotechnol..* **26** (2): 375-381.

Gazeta Mercantil. "ANP estima que consumo del alcohol supere gasolina". Agropecuaria Brasil. [gazetamercantil.com.br/GZM](http://gazetamercantil.com.br/GZM). Consultado 05-10-2008.

Goettemoeller, J. (2007). "Sustainable ethanol: biofuels, biorefineries, cellulosic biomass; flex-fuel vehicles, and sustainable farming for energy independence". Praire Oak Publishing. Maryville, Missouri, U.S.A. pp. 42.

Global Biodiesel Market Analysis and Forecasts to 2020. Published: Mar-2010. Report Code: GDAE0112ICR

Gouviea L., (2011). "Microalgae as a feedstock for biofuels". Springer Ed. New York. pp.10

Gustavs L.; Eggert A.; Michalik D.; Karten U. (2010), "Physiological and biochemical responses of green microalgae from different habitats to osmotic and matrix stress," *Protoplasma*, **243**: 3-14.

Hansen J.E. y Mki, S .(2001). "Trend of measured climate forcing agents". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 14778-14783.

Hershkovitz, N.; Ore, A.; Cohen Y. (1991). "Accumulation of trehalose and sucrose in cyanobacteria exposed to matrix water stress" *Appl. and Environ. Microbiol.* **57**(3): 645-648.

Hirano A.; Ueda R.; Hiramaya S.; Ogushi Y. (1997). "CO<sub>2</sub> fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation" *Energy*, **22**(2-3): 137-142.

Hong S.J.; Lee C.G. (2008). "Statistical Optimization of Culture Media for Production of Phycobiliprotein by *Synechocystis* sp. PCC 6701", *Biotech. and Biop. Eng.* **13**: 491-498  
<http://www.miliarium.com/monografías/biocombustibles/bioetanol/bioetanol.asp>. Consultado 02-10-2008.

<http://www.solarweb.net/solar-termica-php/> Consultado octubre 2009.

IdaTech, [www.idatech.com](http://www.idatech.com) (fuel cell systems with up to 10 kW in generating  
Industry Statistics: Annual World ethanol production by country. Renewable Fuel Association. USA (2008). [www.ethanolrfa.org/industry/statistics](http://www.ethanolrfa.org/industry/statistics) . Consultado 30-09-2008.

Industry Statistics: Annual World Ethanol Production by Country. Renewable Fuels Association (2008). [www.ethanolrfa.org/industry/statistics](http://www.ethanolrfa.org/industry/statistics). Consultado 26-09-2008.

Instituto para la Diversificación y Ahorro de Energía, Ministerio de Industria, Turismo y Comercio, Gobierno de España (2008), [www.idae.es](http://www.idae.es). Consultado 26-09-2008.

International Energy Agency.(2010). World Energy Outlook. OECD/IEA. France.77-139.

Heliocentric Energiesysteme, (2009) [www.heliocentris.com](http://www.heliocentris.com) (educational fuel cell kits)

Joset, R.; Jeanjean, M. (1996). "Dynamics of the response of cyanobacteria to salt-stress: deciphering the molecular events". *Physiol. Plant*, **96**: 738-744.

Koonin, Steven, E. (2008). "¿Podemos tenerlo todo? *Letras Libres*. Septiembre. |Leshem, Y., Kuiper, P., (1996). "Is there a Gas response to various types of environmental stress?", *Biol. Plant.*, **38**: 1-18.

Lehninger, A.L. (2004). "Principles of Biochemistry"; Fourth Edition, Ed. W. H. Freeman.

Lele S.; Kumar J., (2007) "Algal Bioprocess Technology" New Age International, India. p.p.5-18

Libro Botánica On-Lin. <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/fotosintesis>. Consultada 12-10-2008.

Lin, Y.; Tanaka, S. (2006). "Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospect". *App. Microb. Biotech.* **69**: 627-642.

- Los D.; Murata N. (2004). "Membrane fluidity and its role in the perception of environmental signals". *Bioch and Bioph Acta*. **1666**: 142-157.
- Ma F.; Hanna, M.A.(1999). "Biodiesel Production: a review". *Bioresourcer Technol*. **70**: 1-15.
- Mackay. M.A.; Norton, R.S.; Borowitzka, L.J. (1984). "Osmoregulation in *Thiobacillus ferrooxidans*: Stimulation of iron oxidation by proline and betaine under salt stress" *J. Gen Microbiol*. **130**: 2177-2191.
- Madigan, M.TE.; Martinko, J.; Parker, J. (2006). "Brock, Biología de los microorganismos" Decima edición. Pearson Educación. España. pp 418-492.
- Maksimova I.; Bratkovskaya L.; Plekhanov S. (2004). " Extracellular carbohydrates and polysaccharides of the alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39" *Biol. Bull*. **31**(2),: 175-181.
- Melis Tasios, (2004). "Maximizing Photosynthetic Efficiencies and Hydrogen Production in Microalgal Cultures Fy 2004 Progress Report. DOE Hydrogen Program. pp.. 71-74
- Miller G.L. (1959). "Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar". *Nal. Chem*, **3**(3): 426-428.
- Mikkat, S; Effert, U.; Haggeman M. (1997). "Uptake and use of osmoprotective compounds trehalose, glucosylglycerol and sucrose by cyanobacterium *Synechocystis sp.* PC 6803", *Arch. Microbiol.*,**167**: 112-118
- Ministerio de agricultura y Desarrollo Rural, Colombia [www.minagricultura.gov.co](http://www.minagricultura.gov.co) Consultado 26-09-2008.
- Mitra, M.; Melis A. (2008). "Optical properties of microalgae for enhanced biofuels production". *Optics Express*, **16**(6): 21807-21820.
- Mousdale, D. (2008). "Biofuels: Biotechnology, Chemistry and Sustainable Development". CRC Press U.S.A .pp.33-44
- Muller J.; Xie Z.P.; Staehelin C.; Mellor R.; Boller T.; Wiemken A. (1994). "Trehalose and trehalasa in root nodules from various legumes". *Physiol. Plant*. **90**: 86-92.
- Mus F.; Dubini A.; Seibert M.; Posewitz M.C.; Grossman A.R.(2007). "Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*: anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways". *J Biol Chem.*;**282**(35): 25475-86.



Myhre, G. (1998). "New estimates of radioactive forcing due to well mixed greenhouse gases". *Geophys. J. Res. Let.*, **25**(14): 2715-2718.

Nath K.; Kumar A., Das D. (2005). "Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O.U.001 using spent media of *Enterobacter cloacae* strain DM11". *Appl. Microbiol. Biotech* ;**68**(4): 533-41 .

National Ethanol Vehicle Coalition. (2008). NEVC Newsletter **14** (13).

National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy. Data Analysis and trends: Light duty. [www.card.iastate.edu/publications/DBS/PDFFiles/07bp51.pdf](http://www.card.iastate.edu/publications/DBS/PDFFiles/07bp51.pdf). Consultado 10-10-2008.

National Renewable Energy Laboratory. (1998) "A Look back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program- Biodiesel from Algae" July 1998

National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/taxonomy/>. Consultado 16-06-2011

Okamoto M.; Miyahara T.; Mizuno O.; Noike T. (2000). "Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes". *Wat. Sci. Tech.* **41**(3): 25-32.

Oren A. (2002). "Halophilic Microorganisms and their Environments". Kluwer Scientific Publishers, Dordrecht., Germany.

Oren A., (2007). "Diversity of organic osmotic compounds and Osmotic Adaptation in Cyanobacteria and Algae". En *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*". J. Seckbach Ed. Springer. pp 639-655

Oxfam. "Another inconvenient Truth" Oxfam Briefing paper 114 [www.oxfam.org.uk/resources/policy/climate\\_change/bp114\\_inconvenient\\_truth.html](http://www.oxfam.org.uk/resources/policy/climate_change/bp114_inconvenient_truth.html) - 22k. Consultado 08-09 2008.

Page-Sharp M.; Behm C.; Smith, G., (1999). "Involvement of compatible solutes trehalose and sucrose in the response to SALT stress of cyanobacterial *Scytonema* species isolated from desert soils". *Bioch. et Bioph Acta* **1472**: 519-528.

Petróleos Mexicanos. Informe de Desarrollo Sustentable, PEMEX 2007. México

Perspectiva Energética Mundial. International Energy Agency (2006).

- Porchia, A.; Salerno, G. (1996). "Sucrose biosynthesis in a prokaryotic organism: Presence of two sucrose-phosphate synthases in *Anabaena* with remarkable differences compared with the plant enzymes". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 13600-13604.
- Posten C.; Schaub G. (2009), "Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels- A process view," *J. of Biotech.* **142**: 64-69.
- Qu Q.; Lee .J.; Boss W. (2004)." TreT, a novel trehalose glycosyltransfering synthase of the hyperthermophilic archeon *Thermococcus litorales*". *J. Biol.Chem.* **279**: 47890-47897.
- Ranga R.; Dayananda C.; Sarada R.; Shamala T.R.; Ravishankar G.A. (2007). "Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents" *Biosource Technology* **98**: 560:564
- Reed, R.H. (1983). "Measurement and osmotic significance of 6- dimethylsulniopropionate in marine algae". *Mar. Biol. Lett.* **4**: 173-181.
- Reed. R.H.;, Richardson, D.L.; Warr, S.R.; Stewart, W.D. (1984). "Carbohydrate accumulation and osmotic stress in cyanobacteria". *J.Gen Microbiol.* **130**: 1-4.
- Reed R.H. (1985). "Osmoacclimation in *Bangia atropurpurea* ( *Rhodophyta*, *Bangiales*) – the osmotic role of floridosides". *Br Phycol. J.* **20**: 211-218.
- Reed R.H.; Stewart W.D. in Rogers, L.J., Gallon, J.R. (Ed), ( 1988), "Biochemistry of algae and cyanobacteria". The Photochemical Society of Europe. Oxford Science Publisher. UK. pp. 213-217.
- Reed R.H., (1990). "Solutte accumulation and osmotic adjustment". En Cole, K.M.. y Sheath R.G.(Ed) en *Biology of the Red Algae*. Cambridge University Press., Cambridge UK. pp 147-170.
- Renewable 2010 Global status report: renewable energy policy network for the 21<sup>st</sup> century. (2010). Deutsche Gesellschaft für technische zusammenarbert. pp. 9-14
- Renewable Energy Technology Characterizations. Office of Utility Technologies, Energy Efficiency and renewable. (1997). Energy. U.S. Department of Energy.
- Rippka, R.; Josette D.; Waterbury J.; Herdman M.; Stanier R.Y. (1979). "Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria," *J. Gen. Microbiol.,.* **111**: 1-61.

- Sanders, W. B., (2005). "Observing microscopic phases of lichen life cycles on Transparent substrata placed in situ". *The Lichenologist* **37**(5): 373-382.
- Satoh K.; Murata K. (Ed). (1998) "Stress responses of photosynthetic organisms" *Elsevier Science*. Amsterdam.
- Shanab S.; Galaj H. (2007). "The interactive effect of salinity and urea on growth, some related metabolites and antioxidant enzymes of *Chlorella* sp. and *Senedesmus* sp". *New Egyp J. of Microbiol.* **17** (2): 64-75
- Schiraldi Ch.; Lernia I.; De Rosa M., (2002). " Trehalose production: exploiting novel approaches". *Trend Biotechnol.*, **20**: 420-425.
- Schobert, B.(1977). "Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants?"..*J. Theo. Biol.* **68**: 17-26.
- Shilpkar D.; Harish; Sundaramoorthy S. (2010). "Growth Pattern of Some Desert Algal Isolates and Selection of Media". *J.Adv.Dev.Res.*, **1**(1): 29-31
- Stacey G.; Van Baalen C.; Tabita F.(1977). "Isolation and characterization of a marine *Anabaena* sp. capable of rapid growth on molecular nitrogen".. *Arch. Microbiol.*, **144**: 197-201.
- Stainer R. (1996) " Microbiología" "2<sup>nd</sup>. Ed.. Reverte., España pp 195-206.
- Steinn, (1973). Handbook of phycological methods, Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge at the University Press UK. pp 448 .
- Streeter J.G.; Bhaqwat A.:(1999), "Biosynthesis of Trehalose from maltooligosaccharides in *Rhizobia*". *Can J. Microbiolol.* **45** (8): 716-721.
- Sustainable Biotechnology (2009).  
<http://sustainablebiotech.wordpress.com/2009/04/02/algae-bioethanol-next-gen-biofuel-or-niche-market/>
- Vazquez-Duhalt R.; Arredondo B. (1991), "Haloadaptation of a green alga. *Botryococcus braunii* (race A)" *Phytochem.* **30**(9): 2919-2915.
- Vernon D.; Bohnest H. (1992) "A novel methyl-transferase induced by osmotic stress in facultative *Mesembryanthemum crystallinum*" *EMBO J.* **11**:2077-1085.

Vonshak, A. (ed.) (1997). "*Spirulina platensis (Arthrospira)*". Physiology, Cell-biology and Biotechnology. London: Taylor & Francis.

Warr S.R.; Reed R.H.; Stewart W.D.(1985). "Carbohydrate accumulation in osmotically stressed Cyanobacteria (Blue- Green algae): Interactions of temperature and salinity" *New Phytol.* **100**: 285-292.

Xin L.; Hong-ying H.; Ke G.; Jia Y. (2010), "Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources". *Ecol. Eng.* **36**: 379-381

## **X ANEXO**

### ***Productos de investigación.***

Congresos:

"Efecto del choque osmótico en la producción de azúcares fermentables por algas". Fernández Linares Luis, Bremauntz Michavila Ma. del Pilar, Torres Bustillos Luis, Garibay Orijel Claudio, Cañizares Villanueva Rosa Olivia. Ii Congreso de la SOLABIAA Cancún México 5-9 de Diciembre 2010.

"Obtención de azúcares fermentables obtenidas como compuestos osmorregulación por microorganismos fotosintéticos" Ma. del Pilar Bremauntz, Luis Gilberto Torres Bustillos, Claudio Garibay Orijel, Rosa Olivia Cañizares Villanueva y Luis Fernández Linares. Semana de la Ciencia y la Innovación. ICyT, D.F., 23 de noviembre 2010.

"Obtención de azúcares fermentables obtenidas como compuestos osmorregulación por microorganismos fotosintéticos" Ma. Del Pilar Bremauntz, Luis Gilberto Torres Bustillos, Claudio Garibay Orijel, Rosa Olivia Cañizares Villanueva y Luis Fernández Linares. 2° Foro de Biotecnología 2010. UPIBI.IPN. México D.F.. 10- 12 Noviembre 2010

"Obtención de azúcares fermentables obtenidas como compuestos osmorregulación por microorganismos fotosintéticos" Ma. Del Pilar Bremauntz, Luis Gilberto Torres Bustillos, Claudio Garibay Orijel, Rosa Olivia Cañizares Villanueva y Luis Fernández Linares. XX Congreso Latinoamericano de Microbiología. Montevideo Uruguay, 27 al 30 de septiembre 2010.

“Fermentable sugars synthesized as osmoprotectant compounds by photosynthetic microorganisms”. Ma. del Pilar Bremauntz, Luis Gilberto Torres Bustillos, Claudio Garibay Orijel, Rosa Olivia Cañizares Villanueva y Luis Fernández Linares. 17<sup>th</sup> Annual International Petroleum and biofuels environmental conference. San Antonio Tex. U.S.A. 31 agosto al 2 de septiembre 2010.

“Azúcares fermentables sintetizadas por microorganismos fotosintéticos como compuestos osmoprotectores”  
Ma. del Pilar Bremauntz, Luis Gilberto Torres Bustillos, Claudio Garibay Orijel, Rosa Olivia Cañizares Villanueva y Luis Fernández Linares. XXXVII Congreso Nacional de Microbiología. Morelia, Mich. 29 de junio a 2 de julio 2010.

“Obtención de azúcares fermentables a partir de cianobacterias para la producción de bioetanol”. Ma del Pilar Bremauntz, Silvia Martínez y Luis C. Fernández Linares. 5° Congreso Estudiantil de Investigación. Instituto Politécnico Nacional, 28-30 de octubre, 2009. Queretaro, México.

“Fermentable sugars obtained by photosynthesis pathway for bioethanol production”. Ma. Del Pilar Bremauntz, Silvia Martínez y Luis C. Fernández Linares. Semana del Ciencia y la Innovación. ICYT D.F. 21 de septiembre 2009.

# Trehalose and Sucrose Osmolytes Accumulated by Algae as Potential Raw Material for Bioethanol

Ma. del Pilar Bremauntz<sup>1</sup>, Luis G. Torres-Bustillos<sup>1</sup>, Rosa-Olivia Cañizares-Villanueva<sup>2</sup>, Enrique Duran-Paramo<sup>1</sup>, Luis Fernández-Linares<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Laboratory of Bioprocesses, Department of Bioprocesses, Unidad Profesional Interdisciplinaria de BiotecnologíaUPIBI-Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico; <sup>2</sup>Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN, Mexico City, Mexico.  
Email: pilarbrem@yahoo.com.mx

Received April 29<sup>th</sup>, 2011; revised June 30<sup>th</sup>, 2011; accepted July 10<sup>th</sup>, 2011.

## ABSTRACT

Currently, obtaining sustainable fuels, such as biodiesel and bioethanol, from cheap and renewable materials is a challenge. In recent years, a new approach being developed consists of producing, sugars from algae by photosynthesis. Sugar accumulation can be increased under osmotic stress (osmoregulation). The aim of this study is to show the production of sugars from algae, isolated from natural sources, and the effect of osmotic stress on fermentable sugars accumulation. Strain isolation, production of sugars from each alga and the effect of osmotic stress on growth and sugar production are described. Twelve algal strains were isolated, showing growths between 0.6 and 1.8 g of biomass dry weight /L, all with production of intracellular and extracellular sugars. The strain identified as *Chlorella* sp. showed an increase in sugar production from 23.64 to 421 mg of sugars/g of biomass dry weight after 24 h of osmotic stress with 0.4 M NaCl. Sucrose and trehalose, both fermentable sugars, were the compatible osmolytes accumulated in response to the osmotic stress. The isolated strains are potential producers of fermentable sugars, using the photosynthetic pathway and osmotic stress.

**Keywords:** Algae, Biofuels, Osmoregulators, Carbohydrates, Bioethanol

## 1. Introduction

Carbon neutral renewable fuels, as bioethanol, are decisive in contributing to the replacement of petroleum-derived fuels that contribute to global warming. Production of biodiesel from oil crops and bioethanol from sugarcane and crops in large amounts are not sustainable. An alternative offered by microalgae results from photosynthesis-produced sugars. This production can be increased via osmotic stress as osmolytes accumulation in algae. One mechanism developed by microorganisms as a response to osmotic stress, is the ability to accumulate compatible low-molecular-weight organic solutes such as carbohydrates [1-5].

Three categories of microalgae have been proposed according to their response to salt, a) low stress tolerance to salinity (0.7 M NaCl), with production of sucrose and trehalose, b) medium tolerance to salinity (0.7 - 1.8 M NaCl) with production of glucosylglycerol, and c) high

tolerance to salinity (more than 2.7 M NaCl) with produc-

tion of amino compounds such as glycine, betaine, or glutamate [6-9]. The mechanism by which microalgae produce sucrose is through the production of a complex enzyme sucrose-phosphate synthetase/phosphatase (SPS/SPP) [10].

The aim of this study is to show the effect of osmotic stress in algae fermentable sugars accumulation, as a potential supply source of raw material for alcoholic fermentation.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Algae Isolation and Culture**

Samples were taken from four different places: the Lake of Texcoco, located in the Metropolitan area of Mexico City (salinity 2000 ppm, pH 8 - 10) [11]; the Lake of Guadalupe, in the State of Mexico (fresh water, pH 7.2, salinity 0.3 ppm); a lake in Tabasco, southeastern Mexico (pH 7.2 - 7.8, salinity 2000 ppm); and the river Thames, in Ontario, Canada (pH 6.7, salinity 0.5 ppm).

Samples were taken in bottles and, upon arriving to the laboratory, pH and salinity were determined through conductivity.

Samples were enriched through cultivation in different media according to their salinity, either BG11, BG11 with 25% NaCl, or Guillard [12]. The culture conditions were, in all experiments: fluorescent light in periods of 12:12 h (100 mol/m<sup>2</sup> s); 25°C and aeration 4 vvm (in liquid medium). After two replanting procedures, they were plated onto solid medium (the same culture medium with 10% agar-agar). After 15 days of incubation, samples of each separate colony were taken from the plate and seeded again in a liquid medium culture at the same above mentioned conditions. Isolated strains were conserved in liquid medium with natural light at room temperature [12]. The strains were identified by optical microscopy using a LEICA-DMLB microscope. Each strain was observed and compared with a taxonomy library [13].

## 2.2. Growth Kinetics

A 250-mL flask with 150 mL of selected medium was inoculated (10% inoculum) and cultivated under the previously fixed conditions. Growth was monitored by absorbance (O.D. 600 nm) every 24 h in a colorimeter Genesis 10 UV and by dry weight (dw): culture was filtered through a 0.42 m pre-weighted filter, dried at 80°C for 24 h, and weighted. Culture purity was monitored by optical microscopy.

## 2.3. Intra- and Extra-Cellular Sugars Analysis

The 15-day cell culture was centrifuged at 5000 rpm, for 20 min at 4°C, in a Beckman J2-MC centrifuge. Liquid phase was separated for total carbohydrate determination. For intracellular sugars, biomass was lyophilized, the dry cells (0.01 - 0.05 g) were extracted with 10 mL of 70% ethanol and incubated at 65°C during 4 h, then they were centrifuged at 10,000 rpm for 15 min in a Sorvall Biofugeprimo Centrifuge. The supernatants were collected

and dried at 40°C in an oven. The obtained material was redissolved in 10 mL of distilled water [8,14]. The total carbohydrate content, in both intra- and extra-cellular fractions, was established by the phenol-sulphuric acid method (Dubois Method); and identified by HPLC as established by Müller [8,14]. The supernatants were collected and deionised by shaking with mixed-bed resin (Bio-Rad 501 X8), the solute was filtered through a microfilter (22 µm) prior to injection. A Varian 9002 HPLC with refractive index detector, using a column Phenomenex REYEX organic acid 300X7.8 75985 00H-0138-KO, mobile phase H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at a flow rate 0.3 mL/min, was employed.

## 2.4. Effect of Salt Stress on Growth and Osmotic Shock on Sugar Production

To assess the NaCl concentration effect on growth, isolated strains were grown in BG11 medium with 0, 0.2, 0.4, and 0.6 M NaCl under the same conditions mentioned above. Growth, intra- and extra-cellular, and total carbohydrates were determined during 15 days as indicated before.

The effect of osmotic shock on sugar production was completed by stressing the growth cultures (biomass at 1.5 OD<sub>600nm</sub>) with the addition of NaCl, as concentrated solution, to achieve 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, and 0.6 M; subsequently shocked cultures were incubated during three additional days, growth and intra- and extra-cellular sugars were determined every 24 h, as indicated before.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Photosynthetic Microorganisms Isolation and Its Growth

In the initial stage of this work, twelve different types of photosynthetic microorganisms were isolated and identified, they showed different growths and biomass productions (Table 1).

**Table 1. Identification of isolated algae, place of origin, and biomass produced (g dw/L).**

Orden y Género	Lugar de origen	Máxima biomasa (g/L)	Factor de eficiencia
<i>Chlorococcales Chlorella</i>	Lago de Guadalupe	1.36	29.11
<i>Chyrosphaeaceae Chryso-sphaera</i>	Lago en Tabasco	0.32	5.44
<i>Chlorococcales Trebouxia</i>	Lago de Guadalupe	0.6	6.22
<i>Chlorococcales Chlorella (T)</i>	Lago en Tabasco	0.64	2.70
<i>Chlorococcales Scenedesmus</i>	Río Tamesi, Canadá	1.58	5.37
<i>Chroococcales Synechocystis</i>	Lago de Texcoco	1.74	1.81
<i>Chroococcales Synechocystis (T)</i>	Lago en Tabasco	1.18	0.83
<i>Nostocales Nodularia</i>	Lago de Texcoco	2.16	1.30
<i>Oscillatoriales Lyngbya</i>	Lago de Texcoco	2.56	1.02
<i>Chroococcales Gloeocapsa</i>	Lago en Tabasco	0.9	0.27



<i>Chroococcales Cistococcus</i>	Lago de Texcoco	1.76	0.70
<i>Oscillatoriales Oscillatoria</i>	Río Tamesi Canadá	1.24	2.61

---

\*mg of total sugars/L culture medium

Among the isolated strains, maximum growth (biomass) occurred in increasing order: *Lyngbya*, *Synechocystis*, *Cystecoccus*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, and *Oscillatoria*; they showed a final biomass (dw) higher than 1 g/L (**Figures 1(a) and 1(b)**). A second group of strains: *Gloecapsa*, *Chlorella (T)*, *Trebouxia*, *Nodularia*, and *Chrysozhaera* showed the lowest biomass dw (<1), i.e., 50% less than the *Lyngbya* strain (**Figure 1(c)**).

In order to establish the sugars-production efficiency for each strain, the yield of total sugars production per gram of dried biomass per liter of algae culture was calculated for each strain. *Chlorella sp.*, *Chrysozhaera*, *Chrysozhaera*, *Trebouxia*, and *Scenedesmus* were the most efficient producer strains (**Table1**).

No relationship was found between salinity of the strains place of origin and the natural production (without osmotic stress) of total sugars; for example, strains *Chlorella sp.* and *Trebouxia*, which were isolated from the Guadalupe Lake (fresh water), showed different sugar production rates; from these algae, *Chlorella* produced 4-fold more sugars than *Trebouxia* (**Figure 2**).

Given its high efficiency in sugar production, *Chlorella sp.* was selected for the latter osmotic stress assays.

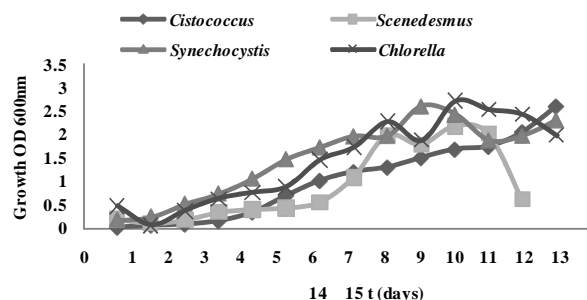
### 3.2. Effect of NaCl Concentration on the Growth and Sugar Production of *Chlorella*

Biomass growth was inhibited at 0.4 and 0.6 M of NaCl, and decreased 28% at 0.2 M (**Figure 3**). Brown [15] reported a similar phenomenon with *Nannochloris bacillaris (Chlorophyceae)*, whose growth was inhibited 300% in seawater (0.8 M). Other studies in cyanobacteria mention that this type of photosynthetic microorganism presents growth inhibition at 0.4 M NaCl [16]. *Chlorella vulgaris* decreases growth 50% at 0.6 M, 30% at 0.4, and 10% at 0.2 M [17]. All these species, including *Chlorella* isolated in this study, undergo a strong growth inhibition even under moderate osmotic stress, which means that they are stenohaline.

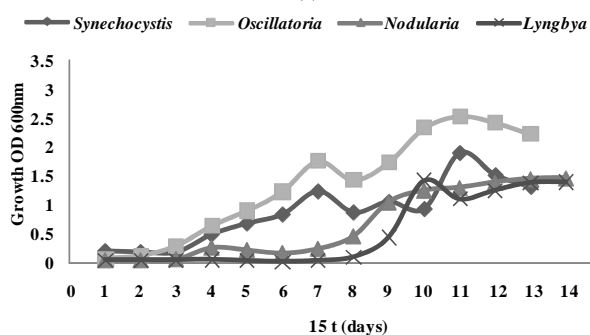
### 3.3. Osmotic Shock Effect on Sugar Production

When *Chlorella* was treated under osmotic shock, increments in the production of sugars were observed (**Figure 4**). Total sugar production was 18-fold higher after 24 h of osmotic shock using 0.4 M NaCl (421 mg/g of biomass dw).

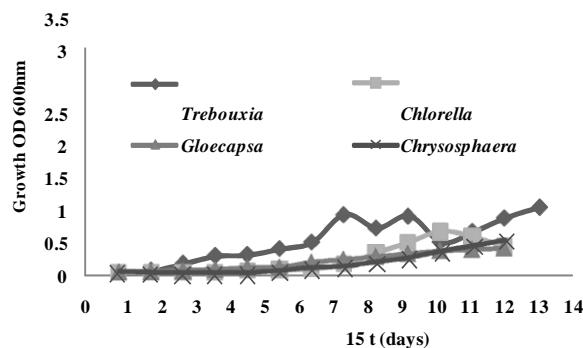
Page *et al.* [8] reported a 15-fold increment of total sugar production under osmotic stress for a strain of *Syntonema*, after 24 h in 0.15 M NaCl. When *Synechocystis* PCC 6714 was grown in BG11, total carbohydrate production increased above 13-fold when the medium was changed to a BG11/100% seawater [18].



(a)



(b)



(c)

After salt stress, sucrose and trehalose concentrations increased from 1.13 to 1.95 and from 0.012 to 0.019

**Figure 1. Kinetic growth of isolated strain cultures in BG11medium.**

mg/g biomasse dw, respectively, in *Chlorella*. Under salt stress, *Scytonema* produced sucrose and trehalose, and trehalose concentration was higher than sucrose [8]; perhaps because trehalose has shown superior protein stabilisation capacity [21]. *Chlorella*, under osmotic stress, produced proline and sucrose as osmolytes [19-21], aeroterrestrial "*Chlorella*" *trebouxioides* SAG2142 and "*Chlorella*" *luteoviridis* SAG2196 accumulate the polyols, ribitol and sorbitol [20]. The present study is the first report of trehalose synthesis by *Chlorella* as osmotic response; nevertheless, in this study sucrose concentration was higher than that of trehalose, being the main osmolyte in *Chlorella*.

Algae have been used to obtain different products of interest for humans. Microalgae can provide several different types of renewable biofuels. These include meth-

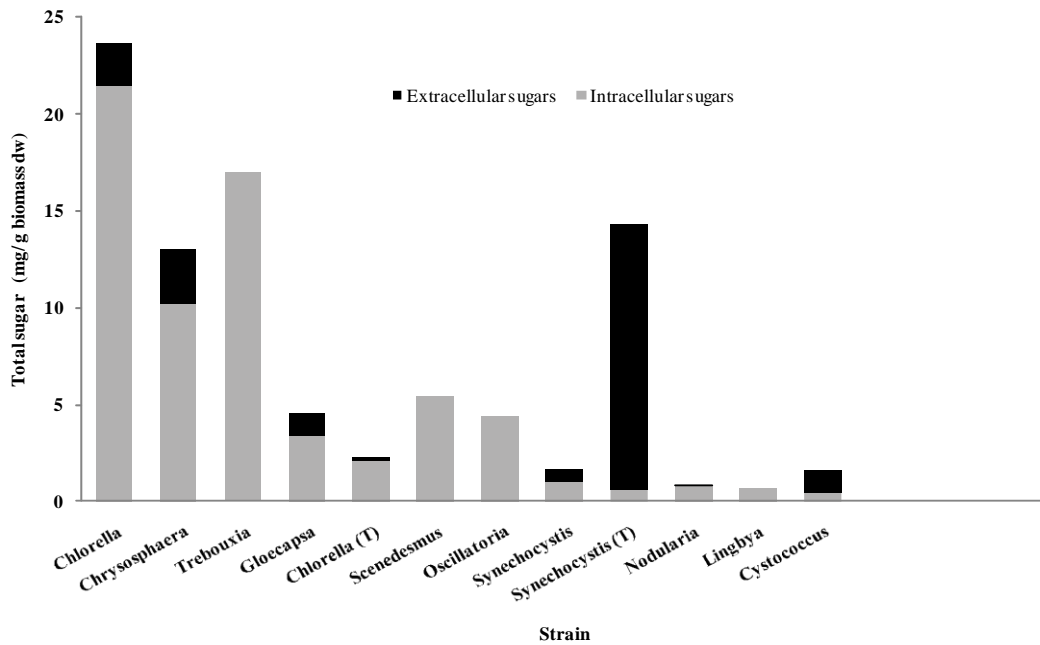


Figure 2. Intra- and extra-cellular sugar production for each isolated strain, grown in BG11 medium without NaCl.

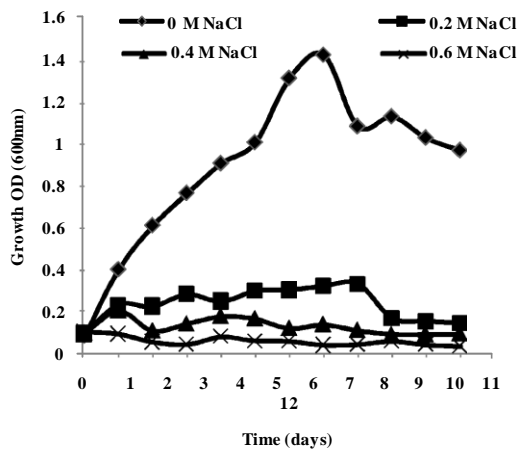


Figure 3. Effect of NaCl concentration on growth of *Chlorella* sp.

ane produced by anaerobic digestion of the algal biomass and biohydrogen produced photobiologically, as well as biodiesel derived from microalgal oil [22], bioethanol from sugars and cellulose [23,24], biomass for combustion or hydrogen and methane production.

Aside from using the sugars produced by algae to obtain bioethanol, other cellular components as lipids and protein can be used for the synthesis of biodiesel and fodder, respectively; making it more feasible economically to obtain biofuels from algae. When *Botryococcus braunii* is grown at different NaCl concentrations, increasing salinity induces a decrease in protein content, but the carbohydrate and lipid contents remain unchanged [25]. Considering the results obtained in the present work re-

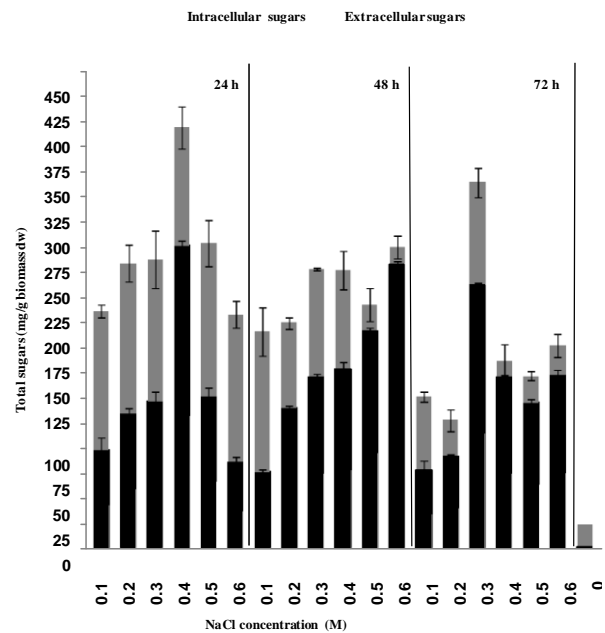


Figure 4. Osmotic stress effect in total sugar production in *Chlorella* sp grown in BG medium.

garding sugars production by *Chlorella*, we estimated the annual production of fermentable sugars, considering a hectare of raceways surface of 0.3 m depth (6000 m<sup>3</sup>), and a harvested biomass of 20% of the volume per day, under four different scenarios: 50% of the maximum biomass production achieved (equivalent to 0.7 g/L) and the maximum biomass (equivalent to 1.36 g/L), both with a sugars yield without osmotic shock (equivalent to

0.02 kg sugar/kg biomass dw), corresponding to scenarios 1 y 2, respectively. A 50% and 100% of the maximum biomass production achieved with a sugars yield after osmotic shock (equivalent to 0.25 kg sugar/kg dw), corresponds to scenarios 3 and 4, respectively (**Table 2**). Algal sugar production was compared to the sugar cane productivity in Colombia, where the best yield is 80 and 9.6 ton/ha of sugar cane and sugar, respectively [26-29].

As for production of sugars, in the case of *Chlorella* in the most conservative condition (scenario 1), the production of sugars is lower (31%) than sugar cane. Nevertheless, for scenario 2, it is 13% higher than that of sugar cane. The two scenarios with osmotic shock, scenarios 3 and 4 are 7 and 14-fold higher than sugar cane, respectively. However, the dilution of sugars in the culture broth is a limiting factor that needs to be considered contrary to sugar cane juice.

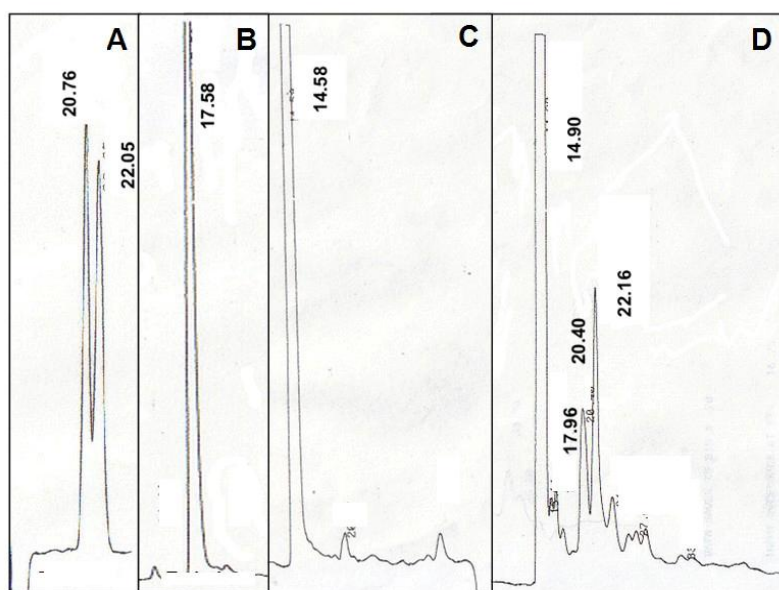
As for *Chlorella*'s by-products, lipids, proteins and residual biomass after extraction (cake) were estimated in a very conservative way (based on our results), the percentage of yields were 10%, 20%, and 50%, respectively. The values of the by-products estimated with *Chlorella* are more than one fold higher than those obtained with African oil palm (*Elaeis guineensis*) (**Table 2**). Nevertheless, many technical challenges remain in regarding to scaling up and adequate process to make the use of algae feasible for the production of biofuels.

#### 4. Conclusions

Twelve strains were isolated from different ecosystems, which produced intra- and extra-cellular carbohydrates. *Chlorella sp.* showed the highest total sugars production, 29.1 mg of sugars/g dw biomass. When salinity level in culture media was increased, culture growth decreased

**Table 2. Comparative scenarios production of sugars, lipids and protein, considering a hectare of raceways surface and 0.3 m depth, and a harvested biomass of 20% of the volume per day. Scenario (1) 50% of the maximal biomass production achieved (0.7 g/L); (2) the maximal biomass (1.36 g/L ) both with sugars yield without osmotic shock (0.02 kg sugar/kg dw), (3) and (4) 50% and 100% of the maximum biomass production with sugars yield after osmotic shock (0.25 kg sugar/kg dw), scenarios 3 and 4, respectively. Sugar cane from Colombia and Oil Palm from Africa.**

Feedstock(scenario)	Biomass	Sugars			Protein	Biomass after extraction
		(Ton/Ha/year)				
<i>Chlorella</i> (1)	294	5.9	29.4	59	147	
<i>Chlorella</i> (2)	571	11	57.1	114	286	
<i>Chlorella</i> (3)	294	73.5*	29.4	59	147	
<i>Chlorella</i> (4)	571	142.8*	57.1	114	286	
Sugar cane	80	9.6	-	5.2 <sup>(32)</sup>	26	
Oil palm	22 <sup>(29)</sup>	2.6 <sup>(29)</sup>	5.7 <sup>(29)</sup>	3.5 <sup>(30)</sup>	5 <sup>(31)</sup>	



**Figure 5. HPLC chromatograms from saccharose standard, A; trehalose standard, B; *Chlorella*'s extract without osmotic stress, C; and *Chlorella*'s extract after 24 h of osmotic stress with 0.4 M NaCl, D.**

with increasing NaCl concentration, and was inhibited at concentrations higher than 0.4 M for all strains.

After the osmotic stress of *Chlorella* culture, sugar production increased 14-fold in 0.4 M NaCl after 24 h. The main osmolyte identified was sucrose; however, trehalose was also accumulated (1.93 and 0.019 mg/ biomasse dw, respectively). These results show the potential use of algae as sugar resource of fermentable sugars and the use of osmotic stress to increase the total sugar production. This work shows also trehalose accumulation as osmolyte by *Chlorella*.

## 5. Acknowledgements

Funding by Instituto Politecnico Nacional PIFI-20100242.

The microscopy studies and strain identifications were led by Dr. Ma. Esther Meave from Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Mexico.

HPLC analyses were made at the Central Analítica, Depto. de Biotecnología, CINVESTAV-IPN and directed by Elvira Rios, Cirino Rojas, and Gustavo Medina.

## REFERENCES

- [1] E. Blumwald, R. Mehlhorn and L. Packer, "Studies of Osmoregulation in Salt Adaptation of Cyanobacteria with ESR Spin-Probe Techniques," *Proceedings of National Academy Sciences*, Vol. 80, 1983, pp. 2599-2602. [doi:10.1073/pnas.80.9.2599](https://doi.org/10.1073/pnas.80.9.2599)
- [2] E. Elsheikh and W. Wood, "Rhizobia and Bradyrhizobium under Salt Stress: Possible Role of Trehalose in Osmoregulation," *Letters Applied Microbiology*, Vol. 10, 1990, pp. 127-129. [doi:10.1111/j.1472-765X.1990.tb00098.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1990.tb00098.x)
- [3] D. Los and N. Murata, "Membrane Fluidity and Its Role in the Perception of Environmental Signals," *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1666, 2004, pp 142-157. [doi:10.1016/j.bbame.2004.08.002](https://doi.org/10.1016/j.bbame.2004.08.002)
- [4] M. A. Luna-Velasco, F. Esparza-García, R. O. Cañizares-Villanueva and R. Rodríguez-Vázquez, "Production and Properties of a Bioemulsifier Synthesized by Phenanthrene-Degrading *Penicillium* sp.," *Process Biochemistry*, Vol. 42, 2007, pp. 310-314.
- [5] M. C. Santiago-Santos, T. Ponce-Noyola, R. Olvera-Ramirez, J. Ortega-López and R. O. Cañizares-Villanueva, "Extraction and Purification Phycocyanin from *Calothrix* sp.," *Process Biochemistry*, Vol. 39, 2004, pp. 2047-2052.
- [6] J. Batterton and C. van Baalen, "Growth Responses of Blue-Green Algae to Sodium Chloride Concentration," *Archives Microbiology*, Vol. 76, 1971, pp. 151-155. [doi:10.1007/BF00411789](https://doi.org/10.1007/BF00411789)
- [7] F. Joeset, R. Jeanjean and M. Hagemann, "Dynamics of the Response of Cyanobacteria to Salt-Stress: Deciphering the Molecular Events," *Physiologia Plantarum*, Vol. 96, No. 4, 1996, pp. 738-744. [doi:10.1111/j.1399-3054.1996.tb00251.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00251.x)
- [8] M. Page-Sharp, C. Behm and G. Smith, "Involvement of Compatible Solutes Trehalose and Sucrose in the Re-

- sponse to SALT Stress of Cyanobacterial *Scytonema* Species Isolated from Desert Solils,” *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1472, 1999, pp. 519-528.
- [9] G. Stacey, C. Van Baalen and F. Tabita, “Isolation and Characterization of a Marine *Anabaena* sp. Capable of Rapid Growth on Molecular Nitrogen,” *Archives of Microbiology*, Vol. 144, 1977, pp. 197-201.  
[doi:10.1007/BF00446862](https://doi.org/10.1007/BF00446862)
- [10] A. Porchia and G. Salerno, “Sucrose Biosynthesis in a Prokaryotic Organism: Presence of Two Sucrose-Phosphate Synthases in *Anabaena* with Remarkable Differences Compared with the Plant Enzymes,” *Proceedings of National Academy Sciences*, Vol. 93, 1996, pp. 13600-13604. [doi:10.1073/pnas.93.24.13600](https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13600)
- [11] National Water Commission Report, “Informe SU-6-C03-3-390,” 1996. <http://www.cna.gob.mx/OCAVM>
- [12] R. Rippka, J. Deruelles, J. Waterbury, M. Herdman and R. Stanier, “Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria,” *Journal of General Microbiology*, Vol. 111, 1979, pp. 1-61.
- [13] P. Bourrely, “Les Algues d’eau douce,” Editions N. Boubeé & Cie., Paris, 1966.
- [14] J. Müller, C. Staehelin, R. Mellor, T. Boller and A. Wilmken, “Trehalose and Trehalase in Root Nodules from Various Legumes,” *Physiologia Plantarum*, Vol. 90, No. 1, 1994, pp. 86-92.
- [15] L. Brown, “Photosynthetic and Growth Responses to Salinity in a Marine Isolated *Nannochloris bacillaris* (Chlorophyceae),” *Journal of Phycology*, Vol. 18, No. 4, 1982, pp. 483-488.
- [16] R. Abed, K. Kohl and D. Beer, “Effect of Salinity Changes on the Bacterial Diversity Photosynthesis and Oxygen Consumption of Cyanobacterial Mats from an Intertidal of Arabian Gulf,” *Environmental Microbiology*, Vol. 9, No. 6, 2007, pp. 1384-1392.  
[doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01254.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01254.x)
- [17] L. Gustavs, A. Eggert, D. Michalik and U. Karten, “Physiological and Biochemical Responses of Green Microalgae from Different Habitats to Osmotic and Matric Stress,” *Protoplasma*, Vol. 243, No. 1-4, 2010, pp. 3-14.
- [18] C. Colaco, C. Smith, S. Sen, D. Roser, Y. Newman, S. Ring, (Eds.), “Formulation and Delivery of Proteins and Peptides. IV Series,” American Chemical Society, Washington, D.C., 1993, pp. 220-240.
- [19] A. Oren, “Diversity of Organic Osmotic Compounds and Osmotic Adaptation in Cyanobacteria and Algae,” In: Seckback Ed., *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environment*, Springer, Berlin, 2007, pp. 639-655.
- [20] A. Ben Amotz and M. Avron, “Accumulation of Metabolites by Halotolerant Algae and Its Industrial Potential,” *Annual Review Microbiology*, Vol. 37, 1983, pp. 95-119.  
[doi:10.1146/annurev.mi.37.100183.000523](https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.000523)
- [21] A. Ben-Amotz and T. Grunwald, “Osmoregulation in the Halotolerant Algae *Asteromonas gracilis*,” *Plant Physiology*, Vol. 67, 1981, pp. 613-616.
- [22] Y. Chisti, “Biodiesel from Microalgae,” *Biotechnology Advances*, Vol. 25, No. 3, 2007, pp. 294-306.

[doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001)

- [23] J. Zaldivar, J. Nielsen and L. Olsson, "Fuel Ethanol from Lignocelluloses: A Challenge for Methabolic Engineering and Process Integration," *Applied Microbiology and Bio- technology*, Vol. 56, No. 1-2, 2001, pp. 17-34. [doi:10.1007/s002530100624](https://doi.org/10.1007/s002530100624)
- [24] C. Posten and G. Schaub, "Microalgae and Terrestrial Bio- mass as Source for Fuels—A Process View," *Journal of Biotechnology*, Vol. 142, No. 1, 2009, pp. 142: 64-69.
- [25] R. Vazquez-Duhalt and B. Arredondo, "Haloadaptation of a Green Alga *Botryococcus braunii* (Race A)," *Phyto- chemistry*, Vol. 30, No. 9, 1991, pp. 2919-2915.
- [26] E. Visser, D. Filhi, M. Martins and B. Steward, "Bioetha- nol Production Potential from Brazilian Biodiesel Co- Products," *Biomass and Bioenergy*, Vol. 35, 2011, pp. 489-494. [doi:10.1016/j.biombioe.2010.09.009](https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.09.009)



